

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Obor: Ekologická a evoluční biologie



Aneta Hrdinová

Vliv těžkých kovů na fyziologii lišejníků

The effect of heavy metals on the physiology of lichens

Bakalářská práce

školitel: Mgr. Ondřej Peksa, Ph. D.

Praha, 2014

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: „Vliv těžkých kovů na fyziologii lišejníků“ zpracovala samostatně pod vedením Mgr. Ondřeje Peksy, Ph.D a uvedla jsem všechny použité zdroje.

V Praze 16. května 2014

vlastnoruční podpis autora

Poděkování

Děkuji všem, kteří mi byli nápomocni během psaní mé bakalářské práce. Děkuji zejména vedoucímu bakalářské práce Mgr. Ondřeji Peksovi Ph.D za cenné rady a ochotu při přípravě této práce a RNDr. Editě Tylové Ph.D za pomoc a cenné rady. Také bych ráda poděkovala své rodině za podporu během studia.

Abstrakt

Lišejníky jsou známé svojí citlivostí vůči změnám životního prostředí, ale mnoho z nich vykazuje řadu tolerancí. Na jedné straně jsou druhy mimořádně citlivé ke znečištění, na druhé straně jsou druhy tolerantní ke znečištění. Mezi takové lišejníky řadíme mj. druhy, které rostou v místech s vyšším obsahem těžkých kovů. Tato místa se vyskytují přirozeně (руды), ale stále více se jich objevuje důsledkem antropogenních činností (emise v průmyslových a městských oblastech, haldy). Interakce mezi fotobiontem a mykobiontem ve stélce zřejmě může vysvětlit úspěch lišejníků v prostředí obohaceném o těžké kovy.

Stres způsobený těžkými kovy vede ke zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku v buňkách fotobionta i mykobionta. Reaktivní formy kyslíku způsobují peroxidaci lipidů poškození proteinů a nukleových kyselin a dále způsobuje degradaci chlorofylů. Přestože mykobiont poskytuje buňkám fotobionta určitou ochranu před nadbytkem těžkých kovů (především vazbou kovových iontů do buněčné stěny a tvorbou ve vodě nerozpustných sekundárních metabolitů), je fotobiont také vystaven nadbytku kovů. Proto si museli oba symbionti vyvinout řadu detoxikačních mechanismů.

Cílem této práce bylo shrnout poznatky o vlivu těžkých kovů na fyziologii lišejníků s důrazem na jejich detoxikační mechanismy, jako je například tvorba metalothioneinů, fytochelatinů nebo sekundárních metabolitů, které jim pomáhají snižovat dopady těžkých kovů.

Klíčová slova: lišejníky, těžké kovy, detoxikace, tolerance, reaktivní formy kyslíku

Abstract

Lichens are known for their sensitivity to environmental changes, however, the tolerance to different changes may vary among particular taxa. There are lichen species extremely sensitive as well as very tolerant to pollution. The species growing in areas with a higher content of heavy metals belong to the second group. These sites may be of natural origin (ore), but very often they have arisen as a result of anthropogenic activities (emissions in industrial and urban areas, various heaps etc.).

The interaction between photobiont and mycobiont in the thallus can probably explain the success of lichens in environment enriched by heavy metals.

The stress caused by heavy metals leads to increasing production of reactive oxygen species in cells of photobiont and mycobiont. Reactive oxygen species cause lipid peroxidation, damage of proteins and nucleic acids, and the degradation of chlorophylls. Although mycobiont provides the photobiont cells partial protection (particularly thanks to binding of metal ions to the cell wall and the formation of water-insoluble secondary metabolites), photobiont is exposed to high amounts of metals. Therefore, both symbionts have developed a range of detoxification mechanisms.

The aim of this thesis was to summarize the findings on the effect of heavy metals on the physiology of lichens with emphasis to detoxication mechanisms, such as formation of metallothioneins, phytochelatins or secondary metabolites, that help lichens to reduce the effects of heavy metals.

Keywords: lichens, heavy metals, detoxication, tolerance, reactive oxygen species

Obsah:

1. Úvod.....	1
2. Biologie lišejníků	1
2.1 Mykobiont	2
2.2 Fykobiont.....	2
2.3 Anatomie stélky	2
2.4 Morfologie stélky	3
3. Kovy.....	3
3.1 Zdroje kovů	3
3.1.1 Přírodní zdroje kovů	4
3.1.2 Antropogenní zdroje kovů	4
3.2 Toxické kovy	4
3.3 Těžké kovy	5
3.4 Esenciální kovy	6
4. Absorpce a metabolismus kovů.....	6
5. Vliv kovů na fyziologii lišejníků.....	8
5.1 Těžké kovy jako stresové faktory	9
5.1.1 Oxidativní stres	9
5.1.1.1 Peroxidace lipidů.....	11
5.1.1.2 Tvorba malondialdehydu.....	12
5.1.2 Degradace chlorofylů.....	12
5.2 Toleranční mechanismy chránící před toxicitou těžkých kovů	13
5.2.1 Sekundární metabolity	13
5.2.2 Hydrofobiny.....	16
5.2.3 Prolin.....	17
5.2.4 Cystein	18
5.2.5 Glutathion	18
5.2.6 Metalothioneiny	20
5.2.6.1 Fytochelatiny	21
6. Závěr	23
Použitá literatura	24
Použité internetové zdroje	29
Použitá literatura – příloha	29
Příloha	32

1. Úvod

Lidé poškozují a ničí přirozené ekosystémy rozvojem zemědělství, měst a průmyslu. Celosvětový dopad našeho jednání je dále umocněn chemickým znečištěním vznikajícím z činností člověka, ať už se jedná o zemědělství, získávání energie nebo průmysl. Chemická degradace má mnoho příčin (pesticidy, freony apod.). Nejzásadnější dopad však nemá naše produkce těchto cizorodých látek, ale neustálé zvyšování množství jednoduchých sloučenin, které se vyskytují v přírodě i přirozeně, jako jsou dusík, fosfor nebo těžké kovy (Townsend et al. 2010). V mnoha zemích je koncentrace těžkých kovů v životním prostředí závažným problémem. Kovy jsou vzhledem ke svým vlastnostem považovány za jedny z nejnebezpečnějších látek, které se v životním prostředí vyskytují. A jelikož je jejich přítomnost vysoce nežádoucí, byly rostliny i živočišné nuceny vyvinout řadu obranných mechanismů pro jejich detoxikaci (Zítka et al. 2007).

Cílem mé práce bylo formou literární rešerše shrnout informace o působení těžkých kovů na fyziologii lišejníků a popsat jejich detoxikační mechanismy.

Lišejníky dlouho patřily k opomíjeným skupinám organismů (Palice & Halda 2005), přestože je najdeme prakticky ve všech typech prostředí včetně kovy kontaminovaných míst. Do popředí zájmu se lišejníky začaly dostávat až ve druhé polovině 20. století spolu se zvyšujícím se zájmem o ochranu přírody a zkoumáním vlivu lidské činnosti na životní prostředí. Dnes již existuje mnoho studií, které se věnují těžkým kovům a lišejníkům. Podstatná část jich je věnována využitelnosti lišejníků (citlivých vůči znečištění i toxitolerantních druhů) pro biomonitoring. Podstatně méně studií se zabývá vlivem těžkých kovů na fyziologii lišejníků. To je zřejmě způsobeno skutečností, že se jedná o symbiotický organismus, který se skládá ze dvou zcela odlišných organismů – houby a řasy, resp. sinice. Každá z těchto složek se v přírodě chrání proti působení těžkých kovů vlastními způsoby (houba vytváří především sekundární metabolity a metalothioneiny, zatímco řasa resp. sinice se brání zejména tvorbou glutationů nebo fytochelatinů). Ovšem symbióza jim umožňuje vytvářet stélku, ve které je řasa (která je považována za citlivějšího partnera v symbióze [Ahmadjian 1993]) do určité míry chráněná mykobiontem. Tato symbióza jim dává možnost osidlovat znečištěná místa, jako jsou haldy, průmyslové oblasti apod. Tedy taková místa, která jsou pro ostatní organismy nevhodná nebo dokonce toxická (Bačkor & Fahselt 2008, Shukla & Upreti 2007).

2. Biologie lišejníku

Lišejníky nejsou taxonomickou skupinou, nýbrž ekologickou skupinou organismů. Jsou složeny ze dvou samostatně žijících organismů a to houby (tzv. mykobiont), která žije v symbióze s řasou, resp. sinicí (tzv. fotobiont). Nicméně ne každé soužití řasy nebo sinice a houby považujeme za lišejník. Jako lišejník označujeme organismus, kde houba s řasou resp. sinicí vytváří morfologicko/fyziologickou jednotku, což znamená, že vytváří vlastní stélku.

Symbiotické soužití autotrofní a heterotrofní složky je založené převážně na trofickém vztahu. Fotobiont získává prostřednictvím houbových hyf vodu a minerální živiny, ale také ochranu proti nepříznivým faktorům prostředí (sucho, nadměrné UV záření, atmosférická depozice, herbivorie). Houbě potom poskytuje

organické látky, vytvořené fotosyntézou (Kalina & Váňa 2010, Kincl et al. 2000). Toto soužití buněk fotobionta s mykobiontem přináší organismu mnoho nových vlastností, kterých ani jeden z těchto organismů sám o sobě nemůže dosáhnout (Palice & Halda 2005). Na základě těchto vlastností mohou lišejníky osidlovat taková stanoviště, na kterých by stěží mohla žít jedna či druhá složka samostatně (vysoké hory, pouště, substráty s vysokým obsahem kovů, extrémně kyselá stanoviště aj.). Přestože jsou lišejníky schopné přežívat na extrémních místech, jsou velmi citlivé ke znečištění životního prostředí (Kalina & Váňa 2010).

2.1 Mykobiont

Lichenizované houby se specializují na tento zvláštní způsob života a jsou zcela závislé na řasách, které jim poskytují uhlík a dusík (Palmqvist 2000). Lichenizace se účastní cca 18 500 druhů hub (68). Většina z nich (někdy se udává až 98 % [Palmqvist 2000]) patří do skupiny vřeckovýtrusých hub (Ascomycetes), ostatní jsou zástupci třídy stopkovýtrusých hub (Bazidiomycetes) a fylogeneticky různorodé skupiny hub Deuteromycetes (Kalina & Váňa 2010, Wornik & Grube 2010).

Mykobiont je dominujícím partnerem, v některých případech tvoří až 90 % lišejníkové biomasy (Ahmadjian 1993) a určuje tak její charakter. K mykobiontu se také vztahuje vědecké jméno lišejníků, zatímco fotobiont má své vlastní jméno (Kalina & Váňa 2010).

2.2 Fotobiont

Počet fotobiontů vyskytujících se ve stélkách lišejníků je vzhledem k počtu mykobiontů velmi nízký, pouze asi 40 rodů zahrnující více než 100 druhů sinic a řas (Tschermaier-Woess 1988). Jenom cca v 8 % případů jsou fotobionti zastoupeni prokaryotickými sinicemi, pak se jedná o tzv. „cyanobionty“, v převážné většině se však jedná o eukaryotické zástupce zelených řas, tzv. „fykobionty“ (Friedl & Büdel 2008). Mezi nejčastěji se vyskytující řasy patří rody *Trebouxia*, *Trentepohlia* a *Coccomyxa*, ze sinic to jsou *Nostoc* nebo *Scytonema* (Ahmadjian 1993).

Některé druhy lišejníkových hub mají pouze jednoho specifického fotobionta se kterým tvoří lišejníkovou stélku. Jiné druhy lišejníkových hub mohou spolupracovat s více druhy fotobiontů (Yahr et al. 2004). To znamená, že jeden mykobiont tvoří morfologicky shodné stélky s různými druhy fotobiontů (Friedl & Büdel 2008), např. rozmanité a nesouvisející linie v rodu *Trebouxia* v krustózním široce rozšířeném lišejníku *Lecanora rupicola* (Blaha et al. 2006). Další druhy lišejníků, jako je například rod *Stereocaulon* obsahují zelenou trebouxioidní řasu jako primárního fotobionta a sinici (*Nostoc*, *Stigonema*) jako sekundárního fotobionta. V takovém případě se sinice nacházejí v cephalodiích, kde fixují dusík (Friedl & Büdel 2008).

2.3 Anatomie stélky

Z anatomického hlediska rozlišujeme lišejníky podle typu stélky na homeomerické a heteromerické.

V **homeomerické** stélce jsou fotobiont a mykobiont rovnoměrně rozloženi. Lišejníky s tímto typem stélky tvoří většinou vláknitý nebo želatinózní charakter stélky (např. rody *Collema*, *Pyrenopsis*).

Velká část lišejníků vytváří **heteromerickou** stélku, která je rozlišená do několika vrstev. Na povrchu je (svrchní a spodní) korová vrstva. Korová vrstva je tvořená buňkami mykobionta, které vytvářejí

pseudoparenchymatickou tkáň. Tvar stélky určuje převážně dřevná vrstva, kterou tvoří vzájemně propletené houbové hyfy, jejichž povrch bývá pokryt krystalky sekundárních produktů. Mezi svrchní vrstvou korovou a dřevnou vrstvou je řasová vrstva tvořená převážně buňkami fotobionta (Kalina & Váňa 2010).

2.4 Morfologie stélky

Přestože vegetativní stélka lišejníků vykazuje velkou variabilitu, je u jednoho a téhož druhu víceméně konstantní. Stanovištní podmínky mohou působit pouze na vznik modifikací (jako je změna barvy nebo tloušťka stélky) (Kalina & Váňa 2010). Vzhled stélky lišejníku je dán především mykobiontem, až na několik výjimek (rody *Ephebe*, *Cystocoleus*), kdy vzhled stélky určuje fotobiont. Stélka se začne rozvíjet až po vytvoření symbiozy a na základě její stavby lišejníky dělíme do tří základních morfologických skupin: keříčkovité, lupenité a korovité lišejníky (Büdel & Scheidegger 2008).

Stélka frutikózních (**keříčkovitých**) lišejníků je vláknitá (*Usnea*, *Bryoria*) nebo keříčkovitá (*Evernia*, *Cetraria*) s plochými nebo válcovitými laloky. Stélka je k povrchu přirostlá jenom bazální částí. Tato skupina zahrnuje také rody, které tvoří dimorfickou stélku rozlišenou v lupenitou nebo korovitou přízemní část a keříčkovitou část stélky (*Baeomyces*, *Cladonia*) (Büdel & Scheidegger 2008, Kalina & Váňa 2010).

Foliózní (**lupenité**) lišejníky mají ploše rozloženou stélku, která přirůstá v jednom či jenom v několika místech k substrátu, od kterého ji lze snadno oddělit. Spodní strana je lemována kůrou, která obvykle nese přichytná vlákna – rhiziny (*Peltigera*). Foliózní lišejníky vytváří širokou škálu rozmanitých stélek (*Parmelia*, *Umbilicaria* atd.) (Büdel & Scheidegger 2008, Kalina & Váňa 2010).

Krustózní (**korovité**) lišejníky jsou celou spodní stranou vrostlé nebo přirostlé k podkladu (*Lepraria*, *Lecanora*, *Porpidia*) a nedají se od podkladu dobře oddělit. Ztráta vody je omezena pouze na horní část exponovaného povrchu. Díky tomu mohou lépe snášet extrémní biotopy, jako jsou holé osvětlené skály (Büdel & Scheidegger 2008).

Typické korovité lišejníky nemají spodní kůru, ale existuje mnoho přechodných typů, které ji mají vyvinutou (Kalina & Váňa 2010).

3. Kovy

Kovy jsou důležitou anorganickou složkou životního prostředí. Zahrnují asi 4/5 všech známých prvků. Jsou charakteristické nízkým počtem valenčních elektronů a snahou odevzdávat své elektrony. To také vysvětluje, proč kovové ionty existují primárně jako kationty, aniontových forem je málo. Další charakteristickou vlastností kovů je, že jsou perzistentní. To znamená, že nepodléhají rozkladu (jako organické látky), ale pouze mění formy, ve kterých jsou přítomny (Mareček & Honza 1998).

3.1 Zdroje kovů

V přírodě se kovy vyskytují ryzí, jako kationty nebo ve formě sloučenin. V ryzí formě se mohou vyskytovat pouze ušlechtilé kovy (např. měď, stříbro, rtuť, zlato). Většina kovů se však v přírodě vyskytuje v podobě sloučenin. K nejběžnějším sloučeninám patří oxidy, sulfidy, halogenidy, případně soli některých kyslíkatých kyselin (např. uhličitany nebo sírany). Tyto sloučeniny zahrnují všechna skupenství – jsou mezi

nimi tuhé látky, kapaliny (hydrogenuhlíčan železnatý, kyselina chromová), i plyny (tetraethylolovo, karbonyly kovů) a mohou tvořit i aerosoly (Honza & Mareček 1998, Kafka & Punčochářová 2002).

Kovy se dostávají do životního prostředí z různých přírodních a antropogenních zdrojů.

3.1.1 Přírodní zdroje kovů

V životním prostředí se kovy pohybují v geochemických a biologických cyklech. Prostřednictvím biologických cyklů přecházejí do živých částí ekosystému, do organismů (Kafka & Punčochářová 2002).

Mezi hlavní přírodní zdroje emisí kovů patří:

- větrem unášené částice půdy (Mn, Cr, V, Sb, Ni, Mo, Zn)
- sopečná činnost (Cd, Hg, Ni, As, Cr, Cu)
- biogenní zdroje (Mn, Zn, Se)
- lesní požáry (Mn, Zn, Cu)
- půdní eroze
- mořská sůl (Fargašová 2009)

Kovy takto mohou kolovat v ekosystému mnoho let. Ovšem tuto křehkou rovnováhu narušuje lidská činnost, která významně přispívá k dalšímu přísunu kovů a jiných živin do ekosystémů.

3.1.2 Antropogenní zdroje kovů

Lidstvo začalo využívat suroviny již od neolitické revoluce, tedy v době, kdy vzniklo zemědělství a mnoho dalších specializovaných řemesel jako je tkalcovství nebo kovářství (WEB 6). Již před 4000 lety začalo lidstvo těžit kovy, ale rozsah těžby byl malý a životní prostředí nijak významně neovlivňovalo. To se ovšem změnilo během 19. a 20. století, kdy se začala využívat energie z fosilních paliv a došlo k nárůstu těžby a zpracování kovů, ale také k nárůstu zemědělství. Dnes antropogenní zdroje kovů překračují mnohonásobně přírodní zdroje (Fargašová 2009).

Antropogenními zdroji kovů jsou zejména:

- těžba a důlní činnost
- zpracování rud
- spalovací procesy
- automobilová doprava
- zemědělství (Fargašová 2009)

3.2 Toxické kovy

Toxické kovy se v důsledku lidské činnosti dostávají v nadměrném množství do životního prostředí a negativně ovlivňují metabolismus živých organismů. Toxicita kovů závisí na teplotě, hodnotě pH, chemické formě kovových iontů, oxidačním stavu kovů, celkovém množství kovu naakumulovaném v buňce/organismu nebo chemické formě. Do skupiny toxických kovů patří například Al, Cr, Cd, Hg, Pb. Mezi toxické kovy můžeme zařadit také některé mikroprvky (Cu, Ni, Zn), které v nadbytku mohou působit toxicky (Purvis & Pawlik-Skowrońska 2008, Pitter 1999).

Toxické kovy mají velkou afinitu k vazbě s aminoskupinami, iminoskupinami a thiolovými skupinami a dále látkami tvořící snadno cheláty v buňkách (Pitter 1999). Přesto mnoho druhů lišejníků toleruje toxické kovy díky detoxikačním mechanismům, jako jsou sekundární metabolity, fytochelatiny apod. (viz kap. 5.2).

3.3 Těžké kovy

Skupina těžkých kovů byla různě definována několika autory. Dnes se nejčastěji používá definice Lapedese, který mezi těžké kovy zahrnuje všechny prvky s hustotou vyšší než 5 g/cm^3 . Ovšem v takovém případě bychom mezi těžké kovy zahrnovali i lanthanoidy, aktinoidy a některé polokovy, na druhou stranu by mezi těžké kovy nepatřil toxický hliník s hustotou $2,7 \text{ g/cm}^3$ nebo berylium ($1,8 \text{ g/cm}^3$) (Mareček & Honza 1998, Nieboer & Richardson 1980a).

Nevýhodou této klasifikace těžkých kovů je, že zahrnují různou škálu prvků s rozdílnými chemickými, fyzikálními a biologickými vlastnostmi. Proto Nieboer & Richardson (1980a) doporučují rozdělit kovy do třech základních skupin (skupina A, skupina B a prvky na rozhraní obou skupin). Tyto skupiny jsou rozděleny na základě rozdílného kovalentního indexu, který ukazuje různé vazebné afinity k prvkům S, N a O. Prvky skupiny A preferují jako donor ligandy, které obsahují kyslík. To znamená, že tvoří nejstabilnější komplexy se sloučeninami, které obsahují karboxylovou, alkoholovou, fosfátovou skupinu atd. Prvky skupiny B preferují ligandy obsahující síru nebo dusík. Mezi tyto ligandy patří sloučeniny s disulfidovou, sulfhydriovou nebo aminoskupinou se kterými tvoří nejstabilnější komplexy. Prvky na hranici skupiny A a skupiny B jsou schopné tvořit stabilní komplexy se všemi druhy ligandů.

Prvky skupiny A: Al, Ba, Ca, Ce, Cs, K, La, Li, Mg, Na, Nd, Rb, Sc, Sr, U a Y

Prvky na hranici skupiny A a skupiny B: As, Cd, Co, Cr, Fe, Ga, Mn, Ni, Sn, Ti, V, Zn

Prvky skupiny B: Cu, Hg, Pb

Umístění těchto prvků v periodické tabulce ukazuje obr. 1.

Legend:

- skupina A (diagonal lines)
- hranice (diagonal lines and horizontal lines)
- skupina B (horizontal lines)

Lanthanoidy:

* Ce Pr Nd Pm Sm Eu Gd Tb Dy Ho Er Tm Yb Lu

aktinoidy:

Th Pa U Np Pu Am Cm Bk Cf Es Fm Md No Lr

Obr. 1.: Periodická tabulka prvků ukazuje rozestavení prvků skupiny A, hraniční skupiny a skupiny B. Označené prvky (dle Martell 1975) jsou nezbytné pro savce a jsou buďto uvedeny tučně – makronutrienty, tučnou kurzívou – stopové prvky a ty prvky, které mohou být prospěšné, jsou označené tenkou kurzívou (Nieboer & Richardson 1980b).

Většinu těžkých kovů můžeme zároveň zařadit mezi kovy toxické. Toxicita těžkých kovů, je dána jejich formou a oxidačním stavem. Zejména ionty kovů, které organismus poměrně snadno vstřebává, jsou nebezpečné. Jejich toxicita spočívá v nahrazování esenciálních kovů v enzymech a jiných biomolekulách ($\text{Cd} \rightarrow \text{Zn}$, $\text{As} \rightarrow \text{P}$, $\text{Se} \rightarrow \text{S}$), čímž mění jejich funkci. Vzniklé sloučeniny se tak mohou projevat jako

enzymatické jedy, což vede k poškození buněk (Raudenská et al. 2012). Například měď, kadmium, olovo nebo rtuť mají tendenci spojovat se s látkami, které tvoří buněčnou membránu a ovlivňují tak jejich permeabilitu. Některé kovy mohou katalyzovat rozklad některých koenzymů, např. lanthanoidy rozkládají ADP (Pitter 1999).

Studium vlivu těžkých kovů na lišejníky je jedním z témat, kterými se zabývají lichenologové. Mnoho lichenologických studií zabývajících se akumulací těžkých kovů v lišejnících je zaměřených na měď, kadmium, železo, olovo a zinek, ale málo pozornosti bylo věnováno dalším stopovým prvkům, jako jsou vysoce toxická rtuť, stříbro nebo arzen (Bajpai et al. 2009). Ve většině článků autoři nerozlišují pojmy těžké kovy a toxické kovy, proto nadále budu používat jednotný termín těžké kovy.

3.4 Esenciální kovy

Kovy nemusí být pro živý organismus jenom škodlivé, naopak některé kovy jsou v určitém množství pro správné fungování živých organismů nezbytné (tab. 1), ale v nadbytku mohou působit toxicky. Takové kovy označujeme jako esenciální. Mezi esenciální kovy rostlin řadíme mezi ně Co (které je nezbytný pro organismy fixující vzdušný dusík - sinice), Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni a Zn.

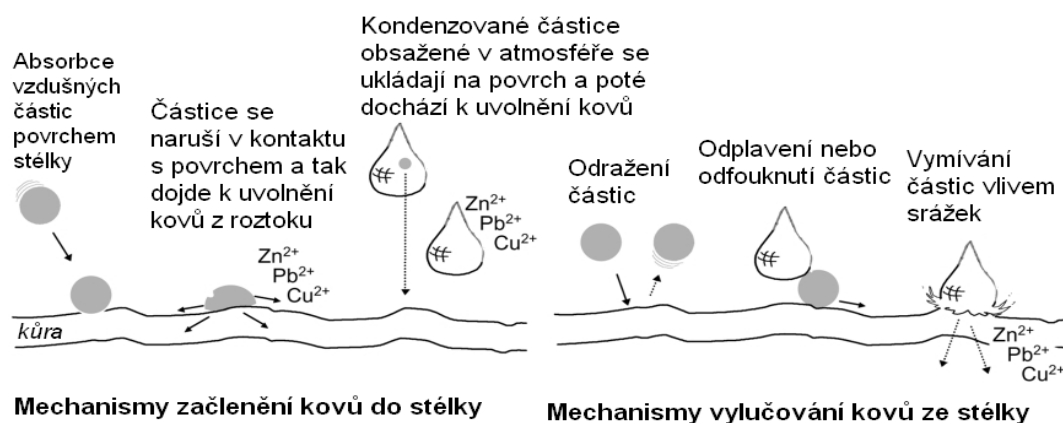
Kobalt	funguje jako kofaktor a aktivátor enzymů, dále je nezbytný pro atmosférickou fixaci N ₂ v cyanolišejnících (Mehra & Farago 1994) a je důležitou součástí stabilizace a biosyntézy chlorofylu (WEB 7)
Měď	je součástí mnoha metaloenzymů (Goyer & Clarkson 1996) a hraje tak důležitou roli ve fyziologických procesech jako je fotosyntéza, dýchání, metabolismus dusíku nebo metabolismus proteinů (Bačkor & Fahselt 2008).
Železo	je také součástí metaloenzymů a zároveň je důležitým prvkem pro syntézu chlorofylu (Mehra & Farago 1994)
Hořčík	je kofaktorem mnoha enzymů podílejících se na látkové výměně (Goyer & Clarkson 1996), dále je důležitou součástí chlorofylů, které jsou tvořeny cyklickým tetrapyrole v jehož centru je vázán atom hořčíku (Pavlová 2005)
Mangan	je důležitou funkční složkou proteinového komplexu rozkládajícího vodu (OEC), který je asociován fotosystémem II (Pavlová 2005)
Molybden	funguje jako nosič elektronů, je důležitý pro metabolismus dusíku, síry a uhlíku a společně se železem jsou součástí nitrogenázy, enzymu, kterým symbiotické prokaryotické organismy fixují vzdušný N ₂ (Goyer & Clarkson 1996, Purvis & Halls 1996)
Nikl	je kofaktorem enzymů hydrngenázy nebo urázy, který je důležitý pro metabolismus dusíku (Pavlová 2005)
Zinek	významně ovlivňuje integritu membrán a je součástí metaloenzymů jako jsou peptidáza, dehydrogenáza nebo proteináza (Bačkor & Fahselt 2008, Purvis & Halls 1996).

Tab. 1.: V této tabulce jsem shrnula některé z nejdůležitějších vlastností esenciálních kovů

4. Absorpce a metabolismus kovů lišejníky

Lišejníky stejně jako ostatní živé organismy, potřebují ke svému růstu a životu některé těžké kovy tzv. mikroelementy. Jelikož jim, na rozdíl od cévnatých rostlin, chybí cévní i kořenový systém, kterým by přijímaly minerální látky ze substrátu, (jenom u několika terikolních druhů, např. *Peltigera* [Goyal & Seaward 1981, 1982a, 1982b] nebo *Phaeophyscia* [Saxena et al. 2007] se předpokládá, že jsou schopné vstřebávat rozpuštěné živiny rhizinami přímo ze substrátu) byly lišejníky nucené vyvinout si specifický

příjem těchto látek. Absence kutikuly a vosků na povrchu stélky umožňuje lišejníkům absorbovat těžké kovy celým povrchem stélky, a to přímo z atmosférických depozic nebo prostřednictvím srážek (obr. 2), často ve velmi vysokém množství (Nash 1989). To ale neznamená, že jsou schopné přijímat všechny látky z prostředí. Jejich absorpce je ovlivněná některými znaky stélky, jako je například typ stélky, drsnost povrchu a velikost pórů, které hrají významnou roli v množství a velikosti zachycených částic (Bargagli & Mikhailova 2002). Přesto se mnoho lišejníků musí umět vyrovnat s přítomností značného množství těžkých kovů ve stélce.



Obr. 2.: Schematické znázornění hlavních absorpčních mechanismů a mechanismů vylučování kovů ze stélky lišejníků (Williamson et al. 2004)

Prvním místem interakce těžkých kovů s buňkami je buněčná stěna a vnější strana plasmatické membrány, které obsahují pevně zabudované polysacharidy, proteiny a fenolické látky. Tyto biomolekuly obsahují funkční skupiny (např. karboxylová-, fosfátová-, aminoskupina, -OH, -SH). Většina z funkčních skupin nese záporný náboj, jsou tedy schopné vázat kladně nabitě ionty kovů v procesu iontové výměny. Výjimkou jsou aminoskupiny, které jsou většinou protonovány, vyskytují se tedy v podobě NH^3+ . Pro iontovou interakci v prostoru buněčné stěny je klíčový především obsah pektinů (jejichž množství se zvyšujícím se množstvím kovů narůstá), jelikož obsahují karboxylové skupiny. Tyto karboxyly mohou být volné, nemetylované a fungují jako záporně nabitá místa pro sorpci kovů. Ale mohou také vytvářet vzájemné propojení pektinových molekul mezi sebou prostřednictvím Ca^{2+} iontů. Touto vazbou buňka ovlivňuje míru zesítování pektinů i velikost pórů v buněčné stěně. Dvoumocné a trojmocné ionty těžkých kovů se mohou vázat jak na volné karboxyly nebo mohou vytěšňovat Ca^{2+} z jeho vazeb (viz rev. Krzesłowska 2011a). Příjem kationtů v procesu iontové výměny je zpočátku rychlý, ale postupně se tento proces zpomaluje, až dojde k nasycení nebo je dosaženo rovnováhy mezi volnými kationty v roztoku a navázanými kationty v místech iontové výměny. Rozsah tohoto procesu je závislý na charakteru míst iontové výměny a afinitě iontů k těmto místům, ale záleží také na povaze a množství dříve navázaných kationtů (Nieboer et al. 1978, Brown & Beckett 1984, Brown & Brown 1991), obecně ale platí, že trojmocné Al^{3+} a dvojmocné ionty Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} vázány pevněji než Ca^{2+} (Krzesłowska 2011b).

Procesem iontové výměny se zabývala například Branquinho et al. (1997). Ve své studii se zaměřili na absorpci mědi lišejníkem *Ramalina fastigiata*, který byl nasbírán v čistém prostředí. Lišejník vystavovali zvýšenému množství mědi a následně pozorovali snížení množství extracelulárně vázaných esenciálních iontů Mg^{2+} a Ca^{2+} , což signifikantně korelovalo se zvýšenou extracelulární koncentrací Cu^{2+} .

Z celkového množství přijatých kovů lišejníkem, je jenom část kovů absorbována intracelulárně. Pro organismus je ale intracelulární příjem těžkých kovů významnější, protože přímo ovlivňuje buněčný metabolismus obou symbiontů. Tento proces je sice pomalejší než iontová výměna (probíhá pomocí membránových přenašečů za spotřeby energie [Farrar 1976]), ale celkové množství přijatých iontů buňkou je závislé na vnější koncentraci kovů a tak se postupem času může neustále zvyšovat množství absorbovaných kovů v buňce (Brown & Beckett 1984). Absorbované ionty kovů jsou nebezpečné svojí schopností vytěsnit již navázané ionty v biomolekulách (nejčastěji se jedná o enzymy nebo proteiny). Obsazení těchto míst nesprávnými ionty může vést k inhibici biomolekul a následně k poškození buňky. Obecně platí, že ionty kovů skupiny B jsou více toxické než ionty na hranici skupiny A a skupiny B a jsou schopné je vytěsnit například z metaloenzymů, které se tak stávají nefunkční. Prvky hraniční skupiny jsou zase více toxické než ionty kovů skupiny A a stejně jako prvky skupiny B mají schopnost vytěsnit je z jejich vazeb (Nieboer & Richardson 1980a). Proto si lišejníky vyvinuly různé detoxikační mechanismy.

Tyto detoxikační mechanismy zahrnují tvorbu ve vodě nerozpustných sekundárních metabolitů, které jsou ukládány v mezibuněčných prostorech stélky nebo tvorbu specifických látek jako jsou glutation, metalothioneiny nebo fytochelatin (viz kap. 5.2).

5. Vliv kovů na fyziologii lišejníků

Lišejníky jsou organismy, které dokázaly obsadit téměř všechny typy terestrického prostředí. Najdeme je na pouštích, v tropických lesích, ale také v tajze nebo tundře, kde tvoří dominantní složku vegetace. Mnoho druhů lišejníků roste také v našich zeměpisných šířkách. V mírném pásmu se sice nemusí neustále potýkat s nedostatkem vody nebo s nízkými či vysokými teplotami, místo toho jsou stále častěji ovlivňovány zvyšujícím se znečištěním prostředí. Toto znečištění má za následek postupné mizení těch druhů lišejníků, které jsou citlivé ke změnám (znečištění) prostředí. Mezi druhy lišejníků, které tak postupně mizí z našeho území, patří *Lobaria pulmonaria* nebo *Alectoria sarmentosa* (WEB 4). Naopak druhy tolerantní ke znečištění se šíří. Mnoho z nich používáme k biomonitoringu prostředí. Například *Hypogymnia physodes* je indikátorem většího množství SO_2 ve vzduchu, ale používá se také pro detekci těžkých kovů (Hauck & Huneck 2007). *Xanthoria parietina* je dalším běžným lišejníkem v urbanizovaném prostředí obohaceným o těžké kovy a oxidy dusíku (Dzubaj et al. 2008).

V této práci jsem se zaměřila na druhy lišejníků, které tolerují prostředí s vysokým obsahem kovů. V příloze¹ jsem vypracovala přehled jednotlivých druhů lišejníků, které rostou na substrátech s vyšším obsahem některých kovů. Tyto druhy mohou akumulovat těžké kovy v takovém množství, které mnohonásobně převyšuje jejich fyziologické požadavky (Bačkor & Loppi 2009).

Ačkoli si lišejníky umí poradit se stresem způsobeným těžkými kovy, jejich mechanismus tolerance stále není zcela pochopen (Pawlik-Skowrońska & Bačkor 2011). A jelikož tu existuje možnost, že by se jejich toleranční mechanismy vůči kovům daly v budoucnu uplatnit při detoxikaci těžkých kovů u rostlin nebo živočichů (včetně člověka), je pro nás důležité správně porozumět fyziologickým procesům, které spočívají nejen v poškození stélky vlivem akumulace těžkých kovů, ale zvláště pak ve schopnosti tolerovat je.

5.1 Těžké kovy jako stresové faktory

Každý živý organismus včetně lišejníků je v průběhu života vystavován působení řady stresových faktorů (teplota, sucho, vysoká vlhkost, herbivorie apod.), které je poškozují. Významným stresovým faktorem, se kterým se živé organismy stále častěji dostávají do kontaktu, jsou těžké kovy.

Působením těžkých kovů dochází k morfologickým a fyziologickým změnám stélky lišejníků. Nadbytek těžkých kovů inhibuje fotosyntézu i respiraci, ovlivňuje aktivitu řady enzymů a proteinů. Všechny tyto změny vedou ke zpomalení růstu a změnám tvaru stélky (zkrácení rhizin, změna barvy atd.). Nicméně z důvodu jejich velmi pomalého růstu se však tyto parametry v experimentálních studiích téměř nepoužívají (použili ji Goyal & Seaward 1981, 1982a, 1982b). Poškození stélky způsobené těžkými kovy ovšem lze měřit nepřímým měřením parametrů, jako jsou permeabilita buněčné membrány, množství chlorofylů a karotenoidů nebo množství produkovaného malondialdehydu (Beckett et al. 2008). Někteří lichenologové hodnotí vliv těžkých kovů na lišejník také podle rychlosti množení a růstu izolovaného fotobionta, která je shodná s volně žijící řasou, resp. sinicí (Bačkor & Váczi 2002).

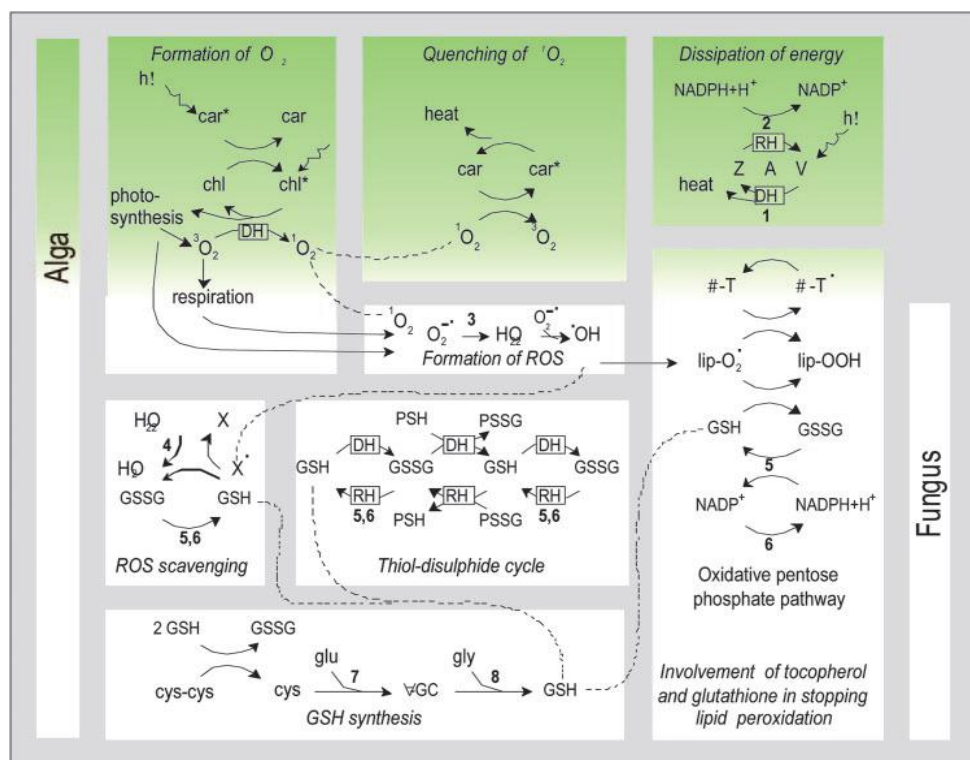
5.1.1 Oxidativní stres

Průvodním jevem negativního vlivu těžkých kovů a jiných stresorů na organismy je vznik tzv. oxidativního stresu. A právě stresové podmínky, které vládly na Zemi během prvohor, zřejmě vedly ke vzniku lišejníkové symbiózy. Tuto teorii podpořili také White & Torres (2010), kteří věří, že lišejníková symbióza je ve skutečnosti obranným mechanismem. Symbióza dala vzniknout mutualistické jednotce, která vykazuje vyšší odolnost vůči abiotickému i biotickému stresu. To potvrzuje také studie Kranner a jejích spolupracovníků (Kranner et al. 2005), kteří prokázali, že antioxidační a fotoprotektivní mechanismy v lišejníkové stélce jsou mnohem účinnější než v izolovaných partnerech.

¹ Součástí této práce je příloha, ve které jsem vypracovala formou rešerše přehled jednotlivých druhů lišejníků, rostoucích na substrátech s vyšším obsahem kovů. Tento přehled jsem pro lepší přehlednost zpracovala do tabulky. Jednotlivé druhy lišejníků jsou seřazeny v prvním sloupci podle abecedy. V prvním řádku jsou uvedeny kovy, které jsou také seřazeny dle abecedy. Výskyt lišejníku na místě s vyšším obsahem určitého kovu je vyznačen podbarvením příslušného pole spolu s uvedením čísla, které odpovídá číslování článků použité literatury (seznam použité literatury je pro přílohu zpracován samostatně).

Společnou vlastností, která provází všechny stresové faktory je produkce reaktivních forem kyslíku (ROS). Většina ROS jsou volné radikály s alespoň jedním volným elektronem, který je dělá vysoce reaktivní (např. superoxid $O_2^{\cdot-}$, hydroperoxyl HO_2^{\cdot} , hydroxylový radikál $\cdot OH$, radikál oxidu dusnatého NO^{\cdot}). Kromě těchto radikálů mezi ROS počítáme i H_2O_2 , O_2 a O_3 , které sice nemají volné elektrony, ale jsou reaktivní, tudíž potenciálně škodlivé (Beckett et al. 2008, Cuny et al. 2002).

Malé množství ROS je v buňce běžně vyráběno jako vedlejší produkt reakcí v buněčném metabolismu, jako je fotosyntéza nebo respirace. Zdravý organismus se s tímto množstvím ROS dokáže vypořádat tvorbou obranných antioxidantů (např. superoxid dismutáza, karotenoidy). Ovšem ve stresovaném organismu dochází ke vzniku oxidativního stresu. Ten nastává, jakmile dojde k narušení rovnováhy mezi množstvím ROS a antioxidačním systémem organismu. Nadbytek ROS vyvolává peroxidaci lipidů, oxidaci proteinů, inaktivaci enzymů nebo mohou způsobit poškození DNA. Aby lišejník přežil, musí být schopen buď snížit tvorbu ROS, nebo je dokázat detoxifikovat jakmile vzniknou (obr. 3) (Blokhina et al. 2003, Cuny et al. 2004, Foyer & Graham 2005).

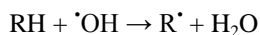


Obr. 3.: Obrázek znázorňuje cesty, které mají za úkol zamezit tvorbě ROS nebo odklízet již vzniklé ROS během vysychání (DH) a dehydrataci (RH) v lišejníku *Cladonia vulcani*. Zelená barva ukazuje procesy přítomné pouze v řasách, tečky označují volné radikály. Singletový kyslík 1O_2 může být vytvořen při přenosu přebytečné excitační energie z chlorofylu (chl) na 3O_2 . Karotenoidy (car), které jsou součástí fotosyntetických pigmentů, mohou odvádět přebytečnou světelnou energii a zneškodnit tak 1O_2 . (V xantofylovém cyklu se violaxantin (V) převede přes anteraxantin (A) na zeaxantin (Z), zatímco sluneční energie je rozptýlená ve formě tepla.) Volné radikály, které vznikají v buňkách, způsobují poškození, pokud nejsou odklizeny včas antioxidanty (T-tokoferol, GSH-glutation). Navíc se mohou vázat na bílkoviny, které obsahují ve své vazbě $-SH$ skupinu a mohou způsobit ireverzibilní tvorbu disulfidových vazeb, které by mohly způsobit denaturaci a vysychání bílkovin. Před tímto poškozením je chrání oxidace GSH za vzniku reverzibilní vazby GSSG (Kranner et al. 2005).

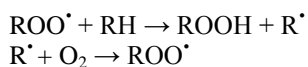
5.1.1.1 Peroxidace lipidů

Proces peroxidace lipidů je zřejmě nejzávažnějším důsledkem oxidativního stresu. Způsobuje změnu fluidity membrány, čímž se zvyšuje její propustnost pro různé ionty. Dále tento proces vede k poškození membránových proteinů, inaktivují se receptory, enzymy a iontové kanály. Zvyšuje se propustnost membrány a dochází ke zvýšenému úniku některých látek, jako jsou K^+ ionty z cytoplasmy do apoplastu. (Tarhanen et al. 1999).

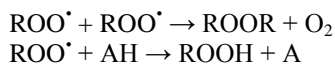
Hlavní cílovou skupinou ROS jsou nenasycené mastné kyseliny v lipidech, které obsahují dvojnou vazbu. Přítomnost dvojných vazeb oslabuje $-CH_2-$ vazby na atomu uhlíku sousedícím s dvojnou vazbou a usnadňuje tak jejich možné odstranění. Z tohoto důvodu jsou polynenasycené mastné kyseliny postranního řetězce membránových lipidů zvláště citlivé na peroxidaci. Lipidová peroxidace může probíhat neenzymovou nebo enzymovou cestou. Enzymová peroxidace lipidů je nezbytná a vede k tvorbě biologicky aktivních produktů, důležitých pro regulaci buněčných pochodů. Pro organismus je nebezpečná neenzymová peroxidace lipidů. Jedná se o nekontrolovatelný proces přeměny lipidů na hydroperoxydy lipidů neboli lipoperoxidy, který probíhá převážně v buněčných membránách a lipoproteinech. Zahrnuje tři části – iniciaci, propagaci a terminaci. Iniciace postupné peroxidace lipidů v membráně je výsledkem napadení některého z ROS (nejčastěji $\cdot OH$) nebo přechodem redukovaných kovů přes membránu. ROS „zaútočí“ na atom vodíku z methylové skupiny ($-CH_2-$) a vezme mu elektron. Vzhledem k tomu, že vodík reaguje s $\cdot OH$ skupinou za vzniku vody, tak na uhlíku $-CH-$ zůstává nepárový elektron. Vznikl tedy radikál lipidu. V jeho struktuře posléze dochází k přeskupení dvojných vazeb a vzniká konjugovaný dien.



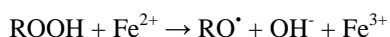
Lipidový radikál je nestabilní a tak v procesu propagace ihned reaguje s dalšími lipidy nebo reaguje s kyslíkem O_2 za vzniku hydroperoxylového radikálu lipidu ($ROO\cdot$). Po vzniku $ROO\cdot$ se může šířit peroxidace lipidů v membráně tím, že odstraní atom vodíku z postranního řetězce jiné polynenasycené mastné kyseliny, za vzniku lipoperoxidu ($ROOH$). Řetězová peroxidace lipidů pokračuje do doby, než dojde k terminaci.



Terminace, je proces, ve kterém dochází sloučením dvou radikálů nebo radikálu a antioxidantu (AH) opět k vytvoření neradikálové sloučeniny.



Vzniklé lipoperoxidy jsou nestabilní molekuly, a v následných reakcích dochází k jejich rozkladu na sekundární produkty (např. malondialdehyd). Rozklad lipoperoxidů může být urychlen přechodem tranzitních kovů a kovových komplexů, které jsou donorem elektronů. Redukované kovové komplexy (Fe^{2+} nebo Cu^+) reagují s lipoperoxidy za vzniku alkoxylového radikálu, OH^- skupiny (hydroxylová skupina) a oxidovaných kovových komplexů (Fe^{3+} nebo Cu^{2+}). Vzniklý radikál stimuluje další řetězovou reakci peroxidace lipidů. (Gutteridge 1995, Halliwell & Gutteridge 1984, WEB 5).



Peroxidace lipidů je řetězová reakce, která vede k poškození permeability membrány. Snížení permeability membrány je jedním z nejvýznamnějších toxických důsledků nadměrného množství těžkých kovů. Proces snížení permeability membrány se nedá přímo měřit. Ale můžeme ho měřit nepřímo, porovnáním množství extracelulárních iontů draslíku, které unikají přes membránu. To také ve svých laboratorních studiích potvrdil Puckett (1976). Prokázal, že k poškození buněčné membrány dochází po vystavení vyššímu množství těžkých kovů (zejména kadmium, kobalt, nikl, olovo) a shledal, že se zvyšující se koncentrací kovů v roztoku zároveň dochází k vyššímu úniku draselných iontů. Současně zjistil, že kovy skupiny B mohou poškodit membránu už při nižší koncentraci než prvky skupiny A.

5.1.1.2 Tvorba malondialdehydu

Malondialdehyd (MDA) je sekundárním produktem lipoperoxidace. Jedná se o vysoce reaktivní tříuhlíkatý ketoaldehyd, který se používá jako biomarker oxidativního stresu. Uvolněný MDA se může vázat přes aminovou nebo thiolovou skupinu na proteiny a nukleové kyseliny a tím je poškozovat (např. přispívá k tvorbě mutací v DNA) (Grotto et al. 2009).

Množství MDA jako indikátor stresu způsobeným těžkými kovy použili např. Dzubaň a kol. (2008), kteří zjistili, že existuje korelace mezi nadměrnou přítomností kovů Cd, Fe, Mn, Pb a Zn a zvýšenou tvorbou malondialdehydu ve stélce druhu *X. parietina*. Také Cañas a její spolupracovnice (1997) potvrdily, že lišejník *Parmotrema conferendum*, poté co byl transplantován do znečištěného prostředí, obsahoval signifikantně vyšší množství MDA než ten samý druh transplantovaný do čistého prostředí.

5.1.2 Degradace chlorofylů

Závažným důsledkem akumulace těžkých kovů je nejen vznik oxidativního stresu, ale také poškození a úbytek fotosyntetických pigmentů – chlorofylů a karotenoidů, který vede ke snížení fotosyntézy a zpomalení růstu stélky. Změna obsahu chlorofylů ve fotobiontu je způsobena jednak změnou stavby chloroplastů (degradace tylakoidních membrán způsobená ROS a úbytek a zduření gran) (Tarhanen 1998) a také schopností těžkých kovů ovlivnit syntézu chlorofylů (poškozují enzymy potřebné pro biosyntézu chlorofylů) a jejich integritu (Bačkor & Fahselt 2008). Některé ionty kovů (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) jsou dokonce schopné vytěsnit hořčík z jeho vazby a ta se tak stává nefunkční (Küpper et al. 2002).

Degradace chlorofylů je často používaným parametrem v lichenologických studiích zaměřených na znečištění těžkými kovy. Již několik výzkumů (např. Bačkor et al. 2007a, Bačkor et al. 2011, Bačkor & Fahselt 2004) potvrdilo, že vyšší obsah kovů ve stélce vede ke snížení obsahu chlorofylu *a*, který vykazuje větší citlivost ke stresovým faktorům a ke zvýšení obsahu chlorofylu *b*. To znamená, že nedochází k výrazné změně obsahu chlorofylů v buňce, ale dochází především ke změně poměru Chl *a/b*. V této přeměně dochází k oxidaci methylové skupiny na chlorofylu *a* za vzniku aldehydové skupiny, kterou obsahuje chlorofyl *b* (Bačkor et al. 2009, Bačkor et al. 2011). Touto transformací se zabývali i Chettri et al. (1998), kteří testovali efekt mědi, zinku a olova na obsah chlorofylu v lišejnících *Cladonia convoluta* a *Cladonia rangiformis*. Jejich výsledky prokázaly, že nadbytek kovů podpořil přeměnu chlorofylu *a* na chlorofyl *b*, ale vysoké množství mědi zároveň vedlo ke snížení celkového obsahu chlorofylu (tedy i chlorofylu *b*) v lišejníku *C*.

convoluta. Také Bačkor & Dzubaj (2004) zjistili, že nadbytek toxických kovů má negativní vliv na biosyntézu chlorofylu. Zejména pokles obsahu chlorofylu *a* je citlivým markerem pro nadbytek kovů. Snížení jeho obsahu sledovali především při nadbytku Cu^{2+} , zatímco rtuť redukovala obsah jak chlorofylu *a* tak i chlorofylu *b*.

Těžké kovy ovlivňují také další kompartmenty, např. mitochondrie. Kovy vedou k narušení správného fungování membrán i membránových proteinů zapojených v přenosu elektronů (včetně možné záměny kovových kofaktorů v enzymech), což způsobuje poškození mitochondriálních funkcí. Tyto změny vedou ke zvýšení hustoty matrixu a otoku mitochondriálních kryst, ale především vedou ke snížení respirační aktivity mitochondrií. S tím souvisí výrazné snížení energie v buňce, které se projevuje snížením obsahu ATP v buňce (Tarhanen 1998). Poškození mitochondrií vede k pomalejšímu růstu lišejníku.

5.2 Toleranční mechanismy chránící před toxicitou těžkých kovů

Lišejníky, přestože tvoří dominantní složku v místech s vyšším obsahem kovů, tak toho o jejich detoxikačních mechanismech stále moc nevíme. Na rozdíl od živočichů lišejníky nemají možnost před stresovými faktory aktivně unikat, proto si musely vůči těmto stresorům vyvinout specifické způsoby rezistence. Mezi významné stresory řadíme také těžké kovy. Většina těžkých kovů působí toxicky již při malých koncentracích. Přesto mnoho lišejníků roste v místech s vysokým obsahem těžkých kovů. Například některé druhy z rodů *Acarospora*, *Aspilicia*, *Cladonia*, *Lecanora*, *Lecidea*, *Porpidia*, *Rhizocarpon*, *Stereocaulon* a *Tremolecia* (Nash 1989).

Lišejníky mohou akumulovat velké množství kovových částic a jiných atmosférických polutantů v mezibuněčných prostorách (Nash 1972, Garty et al. 1979), nebo mohou izolovat kovové ionty v buněčné stěně (Lange & Ziegler 1963, Brown & Beckett 1984). V těchto místech mohou zůstat kovy uložené v neaktivní formě po dlouhou dobu. Imobilizace kovů v mezibuněčných prostorách a v buněčných stěnách chrání do určité míry buňky fotobionta i mykobionta před intracelulární akumulací, proto je vnímáme jako jedny z tolerančních mechanismů lišejníků. Přesto se značné množství kovových iontů do buněk dostane. Proto si buňky fotobionta i mykobionta vyvinuly další mechanismy rezistence. Ty jsou společné s jejich volně žijícími příbuznými (řasami, vyššími rostlinami a houbami) (Brown & Brown 1991).

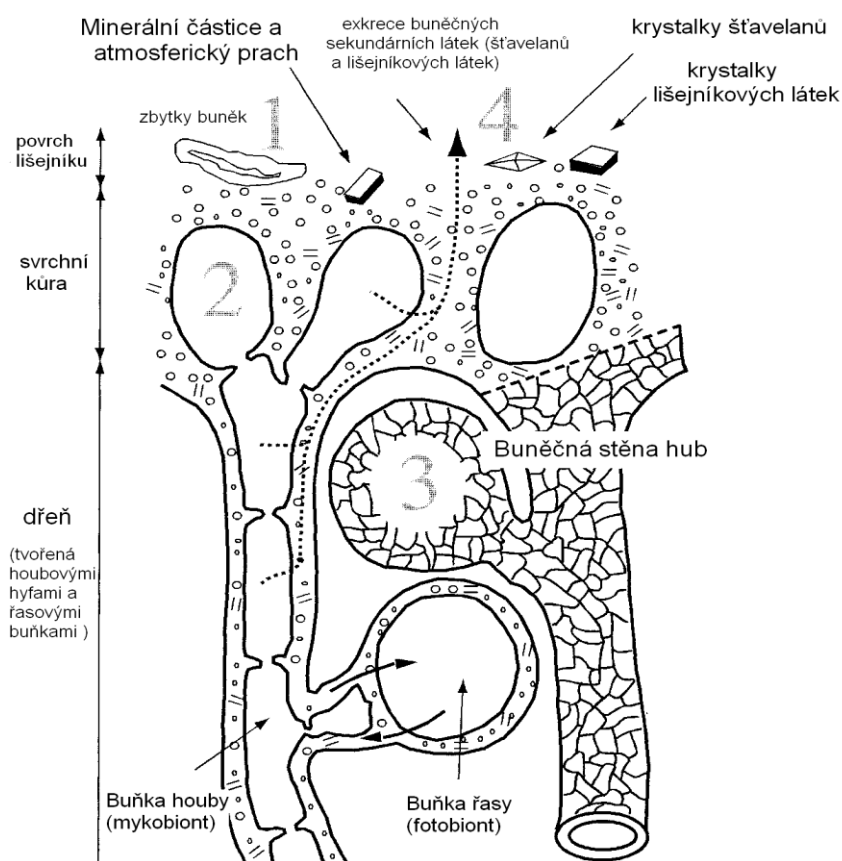
Důležitým místem pro intracelulární akumulaci kovů ve fotobiontu i mykobiontu jsou vakuoly, které tak brání volnému pohybu kovových iontů v cytoplazmě (Krotz et al. 1989, Wang et al. 1992). Ale mnohem efektivnější a významnější pro intracelulární obranu je zřejmě výroba specifických obranných látek. Mezi tyto látky, které se slučují s kovy za vzniku méně reaktivních nebo neaktivních látek patří například sekundární metabolity, fytochelaniny, methalothioneiny a další.

5.2.1 Sekundární metabolity

Lišejníky produkují množství sloučenin, které můžeme dělit na dvě skupiny metabolitů a to primární metabolity a sekundární metabolity. Většinu primárních látek, kam patří proteiny, aminokyseliny, atd. produkují všechny živé organismy.

Sekundární metabolity jsou unikátní pro daný organismus. V minulosti byly sekundární metabolity považovány za odpadní produkt, který vznikl z chyb primárního metabolismu. Předpokládalo se tedy, že nemají význam pro metabolismus ani pro růst. Dnes se již ví, že tento názor je zavádějící. Sekundární metabolity sice nejsou významné pro růst organismu, ale hrají klíčovou roli v obranných mechanismech (Bennett & Wallsgrove 1994) a mohou tvořit až 30 % hmotnosti lišejníku (Bačkorová et al. 2012). Sekundární metabolity se v lišejníku nacházejí ve formě granulí nebo krystalů, které jsou uloženy na vnějších plochách hyf uvnitř stélky, v kůře a ve dřeni (Ahmadjian 1993).

Sekundární metabolity jsou syntetizovány převážně mykobiontem (Takahagi et al. 2008). Mykobiont vyrábí širokou škálu sekundárních metabolitů, které se uvolňují do extracelulárního prostoru a následně krystalizují na povrchu nebo v blízkosti povrchu houbových hyf a řasových buněk (obr. 4) (Bačkorová et al. 2012, Honneger 1986). Tyto látky mohou být buď široce rozptýlené po povrchu, nebo omezené na určitá pletiva. Například atranorin a pigmenty jako kyselina usnová jsou většinou umístěné v kůře stélky, zatímco bezbarvé látky se omezují na dřevnou vrstvu (Sarret et al. 1998).



Obr. 4.: Možné absorpční mechanismy lišejníků a umístění kovů ve stélce. (1) částice obohacené o kovy se zachytávají na povrchu lišejníků a v mezibuněčných prostorách houbových hyf, (2) vnitrobuněčná tvorba komplexů s methalothioneiny (vnitrobuněčný protein jehož primární funkcí je udržení homeostázy těžkých kovů v živých organismech. Syntetizuje se v důsledku přítomnosti dvoumocných kovových iontů, které těsně váže a působí tak detoxifikačně. [Zelená et al. 2004]), (3) extracelulární tvorba komplexů na funkčních skupinách houbových makromolekul z buněčných stěn, (4) extracelulární tvorba komplexů s organickými kyselinami, jako jsou šťavelany nebo lišejníkové látky (Sarret et al. 1998)

Dodnes bylo z lišejníků popsáno více než 800 sekundárních metabolitů. Zajímavé je, že pouze zlomek těchto metabolitů se vyskytuje také ve volně žijících houbách nebo jiných organismech (Hauck & Huneck 2007). Huneck (1999) ve svém článku shrnul některé studie, které prokázaly, že mykobiont a jeho samostatně žijící kultura in-vitro neprodukuje vždy ty samé substance (tab. 2.). Proto můžeme předpokládat, že sekundární metabolity hrají důležitou úlohu v detoxikaci lišejníkové stélky a umožňují lišejníkům přežít na velmi různorodých místech.

druh lišejníku	složky v lišejníku	složky v mykobiontu
<i>Anaptychia hypoleuca</i>	Atranorin	
	Chloroatranorin	
	Norstictic acid	
	Salazinic acid	
<i>Caloplaca ferruginea</i>	Zeorin	Zeorin
	Emodic acid	
	Emodin	
	Fallacinal	
	Parietin	
<i>Stereocaulon curtatum</i>	7-Chloroemodin	7-Chloroemodin
	Atranorin	
	Miriquidic acid	
	Lecanoric acid	Lecanoric acid

Tab. 2.: Metabolity lišejníků a jejich kultivovaných mykobiontů (Huneck 1999)

Sekundárním metabolitům je přičítáno mnoho obranných funkcí a dodnes tato problematika není zcela vyjasněná. Někteří vědci se domnívají, že sekundární metabolity mají chránit stélku před nadměrným UV zářením, což se také prokázalo. Sekundární metabolity, které obsahují aromatické jádro jako je například parietin nebo kyselina usnová, jsou schopné absorbovat UV záření, a chrání tak fotobionta před nebezpečným zářením (Gabriel 1993, Lawrey 1986). Jiní autoři předpokládali, že sekundární metabolity chrání stélku před herbivory, bakteriemi, plísněmi (Lawrey 1986, Pöykkö et al. 2010) nebo před vyššími rostlinami. Například kyselina usnová, atranorin jsou látky, které lišejník toleruje, ale jiným rostlinám mohou škodit, a tak se jejich produkcí může chránit před vyšší růstovou rychlostí některých vyšších a nižších rostlin (Takahagi et al. 2008).

Další teorií je, že vylučováním sekundárních metabolitů vyloučí organismus některé prvky, které jsou v jeho stélce nadměrně zastoupeny a mohly by být potenciálně toxické - tedy že sekundární metabolity fungují jako chelátory těžkých kovů. A tak mohou sekundární metabolity hrát důležitou roli v detoxifikaci těžkých kovů, a mít tak podstatnou roli v imobilizaci kovů (Purvis & Pawlik-Skowrońska 2008). Touto teorií se zabývali Pawlik-Skowrońska a Bačkor (2011). Předpokládali, že lišejníky rostoucí v místě s vysokým obsahem kovů vykazují toleranci vůči těmto místům a zároveň obsahují vyšší množství sekundárních metabolitů, než jedinci rostoucí v čistém prostředí. Tuto hypotézu jim potvrdily lišejníky obývající místa s vyšším obsahem zinku a olova. Všechny druhy lišejníků, které zkoumali, akumulovaly vyšší množství zinku a olova a prokazatelně obsahovaly vyšší celkové množství sekundárních metabolitů, než ty samé druhy rostoucí na neznečištěných místech (tab. 3.).

druh lišejníku	místo odběru vzorků	obsah Zn ($\mu\text{mol/g DW}$)	obsah Pb ($\mu\text{mol/g DW}$)
<i>Hypocenomyce scalaris</i>	Control (A)	4.17 ± 0.06	0.40 ± 0.01
<i>Hypocenomyce scalaris</i>	Polluted (B)	$8.55 \pm 1.40^*$	$1.55 \pm 0.26^*$
<i>Lepraria incana</i>	Control (A)	2.94 ± 1.40	0.29 ± 0.07
<i>Lepraria incana</i>	Polluted (B)	$17.16 \pm 0.66^*$	$2.66 \pm 0.19^*$
<i>Cladonia furcata</i>	Control (A)	1.28 ± 0.06	nd
<i>Cladonia furcata</i>	Polluted (B)	$2.66 \pm 0.05^*$	$1.60 \pm 0.05^*$

Tab. 3.: Obsah kovů ve vzorcích lišejníků rostoucích v neznečištěném místě (Control A) nebo ve znečištěném místě (Polluted B). Data jsou vyjádřena pomocí \pm SE (střední chyba průměru), $n=3$, nd=není zjištěno a symbol * označuje lišejníky s výrazně vyšším obsahem kovů (* $P < 0.05$) (Pawlik-Skowrońska a Bačkora 2011).

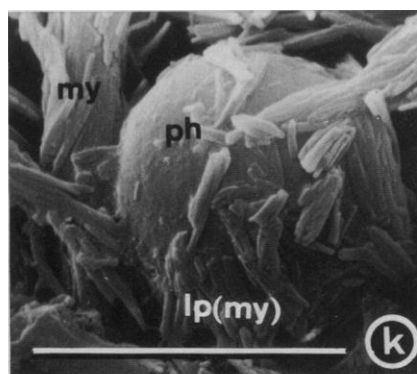
Podle Pawlik-Skowrońské a Bačkora (2011) je tvorba sekundárních metabolitů v lišejnících jedním z nejdůležitějších, pokud ne vůbec nejdůležitějším, typem ochrany organismu před stresem způsobeným těžkými kovy.

5.2.2 Hydrofobiny

Přítomnost nedávno objevených vodoodpudivých proteinů - hydrofobinů, zřejmě také hraje roli v ochraně stélky proti nadměrné intracelulární absorpci roztoků obsahujících těžké kovy (Pawlik-Skowrońska 2002, Dyer 2002).

Tyto látky poprvé určil Wessel se svými spolupracovníky, kteří identifikovali homologní geny kódující malé hydrofóbní proteiny. Zjistili, že tyto proteiny tvoří vysoce nerozpustné komplexy, které vytváří na povrchu buněčných stěn vrstvu, jenž má polokrystalický tyčinkovitý vzor (Wessels et al. 1991).

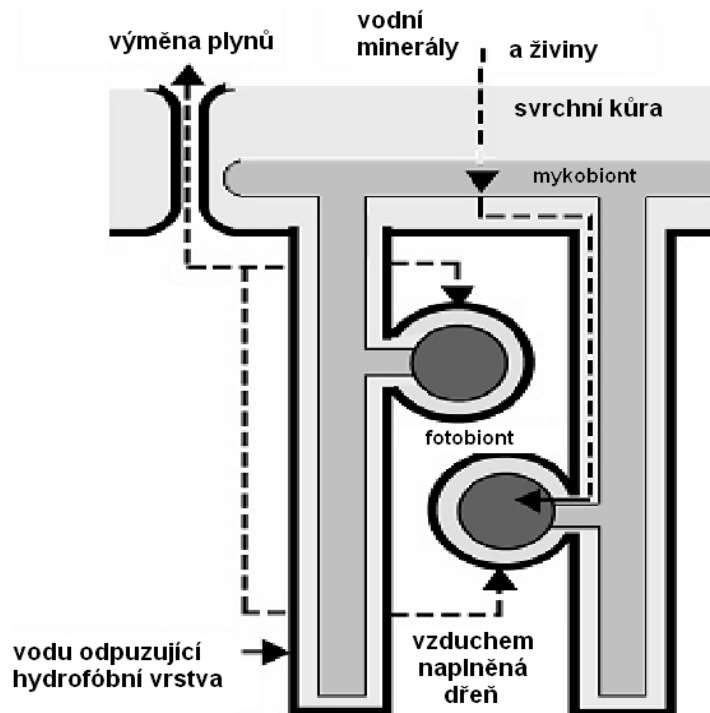
Hydrofobiny jsou unikátní proteiny, které se vyskytují zřejmě pouze u myceliálních hub. Jedná se o proteiny, které obsahují různé aminokyselinové sekvence, ale jsou charakteristické malou velikostí (90-150 aminokyselin), hydrofobicitou, přítomností osmi cysteinových zbytků spojených disulfidickými můstky (tyto disulfidické můstky, přítomné v hydrofóbním monomeru, brání proteinu, aby se shlukoval mimo fázové rozhraní, což by bylo pro houby škodlivé) a schopností samostatně se sestavit do amfipatického filmu na hydrofilním a hydrofóbním rozhraní (Wessels 2000, Cox & Hooley 2009).



Obr. 5.: Přechod hydrofóbní vrstvy z mykobionta na fotobionta (Honegger 1993)

Zdá se, že hydrofobiny mají zásadní význam pro udržení symbiózy v lišejníku, protože houby vylučují monomery hydrofobinů, které difundují do **apoplastu** (prostor obklopující jak mykobionta tak fotobionta).

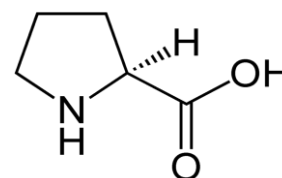
Po dosažení rozhraní s prostory vyplněnými vzduchem, se monomery uspořádají do tenké vrstvy na povrchu obou symbiontů (obr. 5) (Honegger 1993). Podle Honegger (1991) tato hydrofobní vrstva, přítomná na povrchu buněčných stěn, umožňuje, ale zároveň reguluje apoplastický transport vody a v ní rozpuštěných minerálů (včetně kovů) mezi symbionty stejně dobře jako umožňuje optimální výměnu plynů při zamokření (obr. 6).



Obr. 6.: Diagram znázorňující rozložení hydrofobní vrstvy (tučná čára) ve stélce lišejníku (Dyer 2002)

5.2.3 Prolin

Prolin je heterocyklická aminokyselina (WEB 2). V rostlinách je syntetizován z kyseliny glutamové přes pyrrolin-5-karboxylát (P5C), který je následně katalyzován dvěma enzymy P5C syntetázou a P5C reduktázou (Chen et al. 2001). Úloha prolínu v toleranci těžkých kovů není zatím zcela objasněná.



Obr. 7.: Prolin (WEB 2)

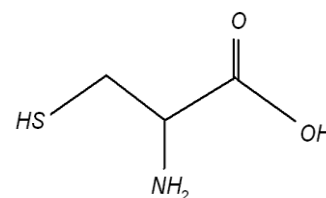
Vyšší akumulace volného prolínu ve stresovaných buňkách vede k nižší intracelulární absorpci těžkých kovů (Wu et al. 1998), menšímu poškození buněčných membrán, proteinů nebo enzymů a dále pomáhá udržet osmotický tlak. To je zřejmě umožněno schopností prolínu vychytávat nebezpečné volné radikály a vytvářets nimi tvoří stabilní komplexy. Udržuje tak redukční prostředí v buňce (stálost poměru $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$), které je důležité pro normální růst (Hare & Cress 2001).

Akumulace prolínu v reakci na stres způsobený těžkými kovy byla pozorována v rostlinách a řasách (Karimi et al. 2012, Mehta & Gaur 1999), ale teprve nedávno byly provedeny tyto pokusy také u lišejníkových fotobiontů. Bačkor a jeho spolupracovníci (Bačkor et al. 2004) sledovali, reakci akumulace prolínu na stres způsobený přebytkem mědi v axenických kulturách u WT kmenu a Cu-tolerantního kmenu *T. erici*. Podařilo se jim prokázat, že Cu-tolerantní kmen má ve svých buňkách v netoxickém prostředí přítomný přibližně stejné množství prolínu jako buňky WT kmenu. Po krátkodobé expozici mědi

akumulovaly oba kmeny přibližně stejné množství mědi, ale Cu-tolerantní kmen akumuloval výrazně vyšší množství mědi vázané extracelulárně v buněčné stěně a plasmatické membráně než WT kmen a zároveň produkoval vyšší množství volného prolinu. Při dlouhodobé expozici obsahovaly oba kmeny podobné množství intracelulární mědi, ale tolerantní kmen opět produkoval vyšší množství volného prolinu. U Cu-tolerantního kmenu také docházelo k výrazně nižšímu úniku K^+ iontů (to může být způsobeno schopností prolinu vytvářet komplexy s těžkými kovy a chrání tak membrány před oxidací [Wu et al. 1998]). Experimentálně přidali roztok s prolinem do média, a potvrdili, že dojde ke zmírnění toxických účinků. Nicméně v tolerantním kmenu byl rozdíl výraznější. Tyto výsledky se téměř shodují s výsledky, které byly zjištěny u druhu *Chlorella vulgaris* (Fathi et al. 2005), potvrzují tedy, že prolin je důležitý pro detoxikaci kovů ve stélce.

5.2.4 Cystein

Cystein je neesenciální aminokyselina, která obsahuje thiolovou skupinu -SH (Bačkor & Loppi 2009). Je součástí mnoha proteinů a enzymů. Podílí se na jejich struktuře tvorbou disulfidických můstků (-S-S-). Thiolová skupina umožňuje proteinům a enzymům vázat různé ligandy a ovlivňuje tím jejich správnou funkci (Pavlová 2005).



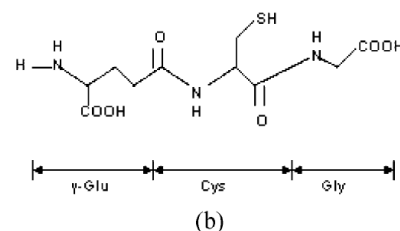
Obr. 8.: Cystein (Pavlová 2005)

Cystein je důležitou složkou skupiny látek, které se označují jako nízkomolekulární thioly (např. glutation, fytochelatiny a metalothioneiny). Zdá se, že tyto sloučeniny mají společně s cysteinem nejvýznamnější roli v toleranci a detoxifikaci těžkých kovů v lišejnících (resp. ve fotobiontech), jelikož těžké kovy mají vysokou afinitu k thiolové skupině cysteinu (Grill et al. 1987).

Význam volného cysteinu v detoxikaci těžkých kovů potvrdili Bačkor et al. (2007), kteří sledovali množství cysteinu ve fotobiontu *T. erici*. Stejně jako u aminokyseliny prolinu také zde zjistili, že Cu-tolerantní kmen produkuje vyšší množství volného cysteinu v nestresované buňce než WT kmen. To znamená, že je tolerantní kmen lépe připraven na stresovou událost. Množství cysteinu se zvyšovalo se zvyšující se koncentrací mědi v obou kmenech, ale u tolerantního kmenu bylo pozorováno vyšší celkové množství cysteinu. Následně oba kmeny vystavili nadbytku kadmia i v tomto případě se potvrdilo, že Cu-tolerantní kmen produkuje více volného cysteinu než WT kmen.

5.2.5 Glutation

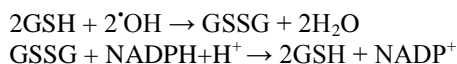
Glutation je nejběžnější nízkomolekulární thiolový tripeptid (GluCysGly), který se nachází ve všech eukaryotních organismech (Bačkor et al. 2007, Kranner & Grill 1996). Hlavní rolí tohoto tripeptidu je obrana proti oxidativnímu stresu (Bačkor et al. 2007), jako jsou vysychání a dehydratace nebo obrana proti toxicitě kovů (Kranner & Grill 1996).



Obr. 9.: Glutation (Pal & Rai 2010)

V buňce se vyskytuje ve dvou formách, jako redukovaný monomer GSH (který převažuje) a oxidovaný bisulfid GSSG. Rovnováha mezi oběma formami je díky jejich redoxním vlastnostem důležitá pro udržení normálního redukovaného stavu buněk. Ovšem během stresu dochází ke zvýšení relativního množství oxidované formy GSSG, proto hraje glutathion (jeho formy) důležitou roli při určování tolerance lišejníků (Kranner et al. 2005, Kranner & Grill 1996).

Glutathion GSH je schopen detoxifikovat řadu těžkých kovů (a jiných xenobiotik) jejich navázáním na -SH skupinu přítomnou na cysteinu, čímž tyto látky inaktivuje. Vazbu s toxickými látkami katalyzují různorodé skupiny enzymů, které nazýváme glutathion-S-transferázy. Vzniklé komplexy jsou specifickými přenašeči glutathionu aktivně přenášeny do vakuoly. Ve vakuole jsou následně komplexy hydrolyzovány. Inaktivovaná látka poté zůstává ve vakuole v komplexu s cysteinem (Pavlová 2005, Blokhina et al. 2003). GSH chrání buňku také před ROS, které inhibuje. Jakmile dojde ke kontaktu radikálů s GSH, dochází k oxidaci -SH skupiny a vzniká -S-S- vazba. To znamená, že z redukované formy GSH vzniká oxidovaný dimer GSSG. Oxidovaná forma GSSG je glutathion reductázou přeměněna zpět na GSH (Kranner et al. 2005).



Díky těmto schopnostem inaktivovat těžké kovy a deaktivovat ROS považujeme glutathion za jeden z nejvýznamnějších intracelulárních obranných mechanismů lišejníků. V mnoha studiích se používá množství glutathionu k hodnocení míry stresu, kterému byl organismus vystaven. Použili ho například Bačkor et al. (2007), kteří zjišťovali, jak ovlivňují měď a kadmium fotobionta *T. erici*. Pozorovali, že se zvyšujícím se obsahem kovů a s časem se snižuje obsah GSH v buňce. Zřejmě je to způsobeno syntézou fytochelatinů, jejichž součástí je glutathion. Obdobnou práci provedla také Ahmer et al. (2002). Ve své práci pozorovali vliv kadmia a mědi na pět druhů mořských řas. Zjistili, že vlivem kovů u nich dochází jenom k malým změnám množství glutathionu. Pouze u druhu *Emiliana huxlei*, po vystavení velkému množství mědi, došlo k výraznému snížení GSH v buňkách, ale zároveň buňky obsahovali vyšší množství cysteinu a dipeptidu γ -Glu-Cys, než ostatní řasy. Proto se zdá, že *E. huxlei* je citlivější k nadbytkům kovů než zbylé druhy řas. U druhů *Phaeodactylum tricornutum* (Cu) a *Dunaliella* sp. (Cd) pak pozorovali výrazný nárůst GSH.

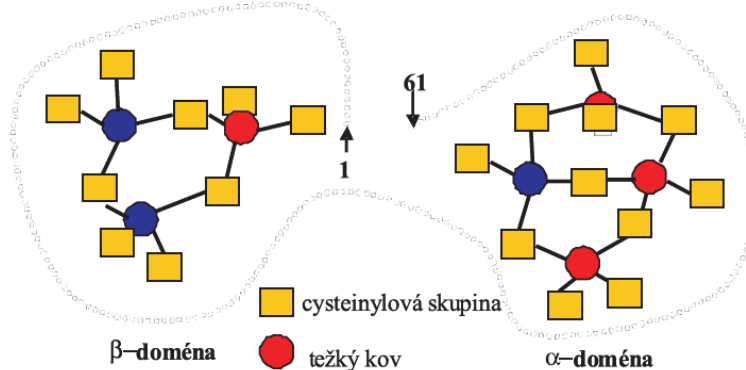
Naopak v aposymbioticky rostoucím mykobiontu *X. parietina* dochází po vystavení nadbytku kovů k výraznému nárůstu GSH v buňce. Ale v mykobiontech *Physconia grisea* a *Physcia adscendens* dochází postupně s narůstajícím množstvím kovů k poklesu GSH v buňce. (velmi drastický pokles byl zaznamenán u nitrofilního druhu *P. grisea*). To by mohlo znamenat, že mykobiont *X. parietina* je schopen tolerovat vyšší množství kovů, protože kovy v cytosolu stimulují další tvorbu GSH. Kdežto u dalších mykobiontů nedochází nebo jenom v malé míře dochází k syntéze GSH, který se oxiduje na GSSG (Pawlik-Skowrońska et al. 2002). Také práce, ve kterých se zaměřují na lišejník jako celek, potvrzují, že ve stélce dochází ke zvyšování obsahu GSH se zvyšujícím se stresem způsobeným kovy (Pawlik-Skowrońska et al. 2002, Cuny et al. 2004) nebo vysoušením a rehydratací (Kranner et al. 2005).

Celkový obsah glutathionu v lišejníku je závislý nejen na životním prostředí, ale také na stáří stélky. Mladší stélky obsahují více GSH (Kranner & Grill 1996). To by mohlo být způsobeno nízkou tvorbou

sekundárních metabolitů, které jsou zřejmě klíčovým prvkem, který udává toleranci lišejníku. Také bylo zjištěno, že celkový obsah glutationu v lišejníku *Cladonia vulcani* je o 30 % vyšší, než je součet obsahu glutationu v izolovaných řasách a houbách. A přesto, že mykobiont obsahuje poměrně vysoké množství glutationu, jeho antioxidační systém je pomalý a neefektivní. Zdá se tedy, že je lišejník přizpůsoben lépe se vyrovnat oxidačnímu stresu než jeho izolovaní partneři (Kranner et al. 2005).

5.2.6 Metalothioneiny

Metalothioneiny (MT) jsou malé nízkomolekulární polypeptidy (6-14 kDa), které mohou být lokalizované na Golgiho komplexu (WEB 3) nebo v lysozomech, ale většinou se vyskytují volně v cytoplasmě (Kizek 2006). Postupně byly nalezeny v živočiších (Margoshes & Vallee 1956), houbách, některých prokaryotech (viz rew. Robinson et al. 1993) a rostlinách (Lane et al. 1987). MT se účastní mnoha buněčných funkcí, především transportu, skladování a detoxikace kovů, metabolismu esenciálních kovů a vychytávání radikálů. MT jsou schopné vázat kovy přes thiolovou skupinu na svých cysteinech (obr. 10). Kovy mohou představovat až 20 % hmotnosti těchto proteinů, které tak hrají velmi významnou roli v regulaci hladiny kovů v buňce a pomáhají tak při detoxikaci organismu (Kizek 2006, Pal & Rai 2010).



Obr. 10.: Schéma předpokládané struktury MT (Blaštík et al. 2006)

MT objevili Margoshes & Vallee roku 1956. Nalezli ho v kůře ledvin u koní, a protože obsahoval značné množství síry a kovů (kadmium a zinek) nazvali ho metalothionein. Poté byly obdobné proteiny nalezeny v celé řadě živočichů, houbách a prokaryotech (viz rew. Cobbett & Goldsbrough 2002). Ale dlouho se nedařilo najít MT geny, které kódují tyto proteiny, u rostlin ani u řas. A poté, co byly roku 1985 objeveny v rostlinách fytochelatiny, které mají velmi podobnou strukturu (Grill et al. 1985), zesílil názor, že rostliny MT neobsahují (Kizek 2006). Ale již o dva roky později Lane se svými spolupracovníky (Lane et al. 1987) našli protein v embryu pšenice a nazvali ho E_C (early-cystein) protein. Poté ale zjistili, že tento protein obsahuje obdobné aminokyselinové sekvence jako MT a také byly schopné vázat Zn²⁺ (Kizek 2006), proto je přiřadili mezi MT.

Jelikož se MT objevené v obratlovcích a ostatních organismech lišily ve své struktuře, tak Klaassen et al. (1999) navrhl rozdělit je do dvou tříd, podle organismu, ve kterém se vyskytují. Já jsem se ale v této práci rozhodla použít rozdělení Rausera et al. (1999), který mezi MT zahrnuje i fytochelatiny a dělí je tedy na základě primární struktury, syntézy a organismu, ze kterého pochází do třech tříd:

MT-I - neboli savčí MT. Nacházejí se u všech obratlovců a jsou charakteristické molekulovou hmotností v rozmezí 6-7 kDa. Většinou jsou tvořeny 61 aminokyselinami, které nemají aromatické jádro. Obsahují 20 cysteinových zbytků, na které může být navázáno až sedm jednomocných nebo dvoumocných iontů kovů (Kizek 2006, Perales-Vela et al. 2006).

MT-II - byly nalezeny v bezobratlých, rostlinách, houbách a některých prokaryotech (Robinson et al. 1993). Tato třída na rozdíl od první třídy nemá tak striktní uspořádání cysteinových zbytků (metallothioneiny). První objevené MT geny z embrya pšenice byly osekvenovány (prvních 59 aminokyselin). Tato část obsahovala 4 páry Cys-x-Cys a dva samostatné cysteiny (Paoli et al. 2010), ale pozice těchto cysteinů není shodná s MT-I. Ovšem dnes je známo více různých pozic cysteinových zbytků. Nejčastěji jsou MT-II geny tvořeny sedmi páry Cys-x-Cys a třemi samostatnými cysteiny (Rauser 1999).

MT-III - neboli fytochelatiny (viz kap. 5.2.6.1 Fytochelatiny).

MT první a druhé třídy jsou kódované MT geny. A na rozdíl od fytochelinů, které jsou syntetizovány enzymaticky skupinou peptidů, vznik MT zahrnuje transkripční kontrolní mechanismy (Pinto et al. 2003, Pal & Rai 2010). Syntéza MT je iniciována navázáním transkripčního faktoru MTF-1 na regulační úsek DNA zvaný MRE (metal responsive element). Tento úsek leží na promotoru genu, ze kterého se syntetizuje MT. Po navázání MTF-1 na MRE je zahájena transkripce. MTF-1 se v buňce nachází v neaktivním stavu spolu s navázaným MTI (metallothionein transcription inhibitor), což je látka, která brání navázání MTF-1 na MRE. K jeho uvolnění dochází poté, co se nějaký kov naváže na MTI, čímž se zahájí transkripce MT. Se vzrůstající koncentrací těžkých kovů se zvyšuje rychlost transkripce MT (Günes et al. 1998), čímž se MT stávají nezbytnými prvky pro detoxikaci těžkých kovů ve všech organismech, ve kterých se vyskytují. V lišejnících stále nejsou známy, ale protože se vyskytují v sinicích (*Synechococcus* [Olfason et al. 1988]), řasách (*Fucus vesiculosus* [Morris et al. 1999]), i houbách, je nejspíš jenom otázka času, kdy se je podaří najít i v lišejnících.

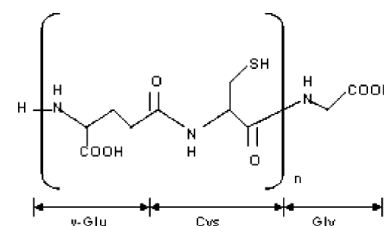
5.2.6.1 Fytochelatiny

Fytochelatiny (PC) jsou malé, obvykle 5-11 aminokyselin dlouhé polypeptidy, které se nalézají volně v celé buňce. Specifické PC jsou syntetizovány jako odpověď na širokou škálu iontů těžkých kovů (Ag^+ , Au^+ , Bi^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Se^{2+} , Sb^{3+} , Zn^{2+}), se kterými vytváří chelátové komplexy, přes thiolovou skupinu přítomnou ve svém řetězci.

Díky této vazbě je tvorba PC účinnou obrannou reakcí nejen lišejníků,

ale i vyšších rostlin vůči těžkým kovům. PC se tedy podílí na akumulaci a metabolismu kovových iontů v buňce. A především pomáhají transportovat kovy do vakuoly, kde jsou imobilizovány (Grill et al. 1987, Pal & Rai 2010, Pinto et al. 2003).

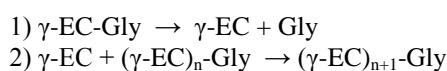
Těchto peptidů si jako první všimli již roku 1973 Anelli a jeho spolupracovníci (Anelli et al. 1973), kteří zjistili přítomnost kov vázajících peptidů v listech tabáku ošetřených rtutí. Roku 1981 byl tento peptid „znovu“ objeven ve kvasincích *Schizosaccharomyces pombe* (Murasugi et al. 1981) a byl pojmenován jako



Obr. 11.: Fytochelatiny (Pal & Rai 2010)

cadystin (Rauser 1999b). Název fytochelatinu poprvé použili Grill et al. (1987b). Název byl odvozený ze slov phyto, jelikož byly izolovány z vyšších rostlin a chelation, protože tyto polypeptidy měly schopnost vázat kovy. Do této doby se myslelo, že PC jsou analogní k funkci MT u zvířat a některých hub (Grill et al. 1987a), ale poté, co byly MT-II nalezeny i u rostlin, navrhl Rauser (1990) změnit název na MT-III, jelikož obě látky jsou důležité pro odpověď rostlin a řas na stres způsobený těžkými kovy.

PC jsou na rozdíl od MT syntetizovány enzymaticky z GSH. Přítomnost iontů těžkých kovů katalyzuje syntézu PC ve dvou různých reakčních krocích. Nejprve je rozštěpena peptidová vazba mezi Cys-Gly v donoru GSH (neboli $(\gamma\text{-EC})\text{-Gly}$) za vzniku $\gamma\text{-Glu-Cys}$ (neboli $\gamma\text{-EC}$) jednotky. Následně je $\gamma\text{-EC}$ jednotka převedena na akceptor, kterým je buď GSH nebo PC_n peptid (za vzniku PC_2 nebo PC_{n+1}). PC syntéza je regulována aktivací enzymu těžkými kovy (Grill et al. 1985, Goldsbrough 2000).



PC jsou skupina látek, které se hojně zkoumají také v lišejnících, resp. eukaryotických fotobiontech. Mykobiont, přestože syntetizuje značné množství GSH, tak PC nevytváří (Bačkor et al. 2007, Pawlik-Skowrońska & Bačkor 2011). Na produkci PC ve fotobiontu *T. erici* se zaměřil Bačkor se svými spolupracovníky (Bačkor et al. 2007). Měřili celkové množství syntetizovaného PC v *T. erici* poté, co byla vystaveny vyššímu množství mědi a kadmia. Zjistili, že dochází ke zvýšení množství PC jak v tolerantním kmenu, tak i ve WT kmenu, který syntetizuje signifikantně více PC než tolerantní kmen. Z toho vyplývá, že množství PC produkovaného během kovové expozice pozitivně koreluje s dostupností kovů a množstvím kovů vstupujícím do buněk fotobionta.

Podobnou studii provedla Pawlik-Skowrońska se svými kolegy (Pawlik-Skowrońska et al. 2002). Měřili množství PC ve třech lišejnících: *X. parietina*, *P. adscendens* a *P. grisea* v odpovědi na zvýšené množství kadmia, zinku a olova. Potvrdili, že se zvyšujícím se množstvím kovů dochází k vyšší produkci PC a zároveň se snižuje množství volného GSH v buňce. Toto zjištění koresponduje s faktem, že GSH je substrátem pro tvorbu PC. Nicméně se ukázalo, že tvorba PC v lišejnících není přímo odpovědná za vyšší toleranci lišejníků vůči těžkým kovům (Pawlik-Skowrońska & Bačkor 2011), ale že hrají významnou úlohu ve snížení toxického vlivu těžkých kovů na lišejníky. PC s jejich volnými ionty vytváří komplexy, které jsou prostřednictvím specializovaných transportérů (ABC-transportéry) uloženy ve vakuole a brání tak cirkulaci volných iontů kovů v cytosolu. Ve vakuole potom mohou být PC degradovány hydrolázami a poté se mohou vracet do cytosolu a opět pokračovat ve své funkci (Tlustoš et al. 2006, Pal & Rai 2010).

6. Závěr

Cílem mé práce bylo shrnout dosavadní poznatky o vlivu těžkých kovů na fyziologii lišejníků. Zvláště jsem se zaměřila na detoxikační mechanismy lišejníků.

Lišejníky jsou poměrně širokou ekologickou skupinou organismů. Mnoho z nich je odolných vůči různým extrémům prostředí, jako jsou např. vysoké koncentrace těžkých kovů.

Kovy se v přírodě vyskytují přirozeně jako součást hornin a půdy, ze kterých mohou být procesem zvětvávání uvolňovány do prostředí. Dnes jsou ale významné také antropogenní zdroje kovů, zejména pak spalovací procesy nebo průmyslová činnost. Díky antropogenní činnosti se stále více kovů uvolňuje z hornin do biogeochemických cyklů a stávají se tak dostupné všem živým organismům (Kafka & Punčochářová 2002, WEB 1). Mezi nejvýznamnější kovové kontaminanty patří vysoce toxické olovo, kadmium a rtuť.

Lišejníky jsou schopné akumulovat velké množství kovů ve stélce. Značné množství kovových iontů je imobilizováno a akumulováno extracelulárně v buněčné stěně nebo na povrchu hyf v sekundárních metabolitech. Buněčná stěna obsahuje pektiny, které jsou schopné vázat kovy přes karboxylovou skupinu. V několika studiích zaměřených na vyšší rostliny se podařilo prokázat, že dochází ke zvýšení množství pektinů v reakci na těžké kovy (viz rew. Krzesłowska 2011). Také v sekundárních metabolitech (které mohou tvořit až 30 % celkové hmotnosti stélky [Bačkorová et al. 2012]) je akumulováno velké množství těžkých kovů. Z tohoto důvodu bych tyto dva procesy považovala za klíčové obranné mechanismy, které lišejníkům umožňují přežít v místech s vysokým obsahem těžkých kovů.

Pro buňky mykobionta i fotobionta je však významnější intracelulární koncentrace kovů, protože pouze kovy uvnitř buňky přímo ovlivňují fyziologické a metabolické procesy související s toxicitou (peroxidace lipidů, degradace chlorofylů atd.). Dnes se stále více prací zabývá intracelulárními detoxikačními mechanismy a lokalizací těžkých kovů ve stélce, přesto toto téma nabízí ještě spoustu otázek. Oba symbionti vytváří různé biomolekuly (např. fytochelatiny, glutation), které mají schopnost vázat kovy a imobilizovat je ve vakuole. Vyšší rostliny, řasy a houby také vytváří obranné biomolekuly, jako jsou glutation, prolin nebo fytochelatiny. Syntéza těchto biomolekul tedy zřejmě není jediným důvodem, proč lišejníky úspěšně kolonizují toxická stanoviště. Spíše jde o evoluční adaptaci – postupné přizpůsobování se extrémním podmínkám, do kterých byly lišejníky postupně „vytlačeny“ díky své malé schopnosti konkurence.

Zatím není známo, jak významná je interakce mezi oběma symbionty a jejich obrannými mechanismy a zda tyto mechanismy opravdu určují toleranci lišejníků.

Součástí předložené práce je na základě literární excerpty vzniklý seznam toxitolerních druhů lišejníků, které rostou v místech s vyšším obsahem kovů (viz příloha).

Použitá literatura

- Ahmadjian V. (1993) *The Lichen Symbiosis*. John Wiley and sons, New York.
- Ahmer B. A., Wei L., Oleson J. R., Ogura N. (2002) *Glutathione and other low molecular weight thiols in marine phytoplankton under metal stress*. Marine Ecology Progress Series **232**: 93–103.
- Anelli G., Pelosi P., Galoppini C. (1973) *Influence of mercury on the amino acid composition of tobacco leaves*. Agricultural and Biological Chemistry **37**: 1579–1582.
- Bačkor M., Váczi P., Barták M., Bud'ová J., Dzubaj A. (2007a) *Uptake, photosynthetic characteristics and membrane lipid peroxidation levels in the lichen photobiont Trebouxia erici exposed to copper and cadmium*. The Bryologist **110** (1): 100–107.
- Bačkor M., Dzubaj A. (2004) *Short-term and chronic effects of copper, zinc and mercury on the chlorophyll content of four lichen photobionts and related alga*. Journal of the Hattori Botanical Laboratory **95**: 271–284.
- Bačkor M., Fahselt D. (2004) *Physiological attributes of the lichen Cladonia pleurota in heavy metal-rich and control sites near Sudbury (Ont., Canada)*. Environmental and Experimental Botany **52** (2): 149–159.
- Bačkor M., Fahselt D. (2008) *Lichen photobionts and metal toxicity*. Symbiosis **46** (1): 1–10.
- Bačkor M., Fahselt D., Davidson R. D., Wu C. T. (2004) *Effects of Copper on Wild and Tolerant Strains of the Lichen Photobiont Trebouxia erici (Chlorophyta) and Possible Tolerance Mechanisms*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **45** (2): 159–167.
- Bačkor M., Kováčik J., Dzubaj A., Bačkorová M. (2009) *Physiological comparison of copper toxicity in the lichens Peltigera rufescens (Weis) Humb. and Cladonia arbuscula subsp. mitis (Sandst.) Ruoss*. Plant Growth Regul **58** (3): 279–286.
- Bačkor M., Loppi S. (2009) *Interaction of lichens with heavy metals*. Biologia Plantarum **53** (2): 214–222.
- Bačkor M., Pawlik-Skowrońska B., Bud'ová J., Skowroński T. (2007b) *Response to copper and cadmium stress in wild-type and copper tolerant strains of the lichen alga Trebouxia erici: metal accumulation, toxicity and non-protein thiols*. Plant Growth Regul **52** (1): 17–27.
- Bačkor M., Péli E. R., Vantová I. (2011) *Copper tolerance in the macrolichens Cladonia furcata and Cladonia arbuscula subsp. mitis is constitutive rather than inducible*. Chemosphere **85** (1): 106–113.
- Bačkor M., Váczi P. (2002) *Copper tolerance in the lichen photobiont Trebouxia erici (Chlorophyta)*. Environmental and Experimental Botany **48** (1): 11–20.
- Bačkorová M., Jendželovský R., Kello M., Bačkor M., Mikeš J., Fedoročko P. (2012) *Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines*. Toxicology in Vitro **26** (3): 462–468.
- Bajpai R., Upreti D. K., Dwivedi S. K. (2009) *Arsenic accumulation in lichens of Mandav monuments, Dhar district, Madhya Pradesh, India*. Environmental Monitoring and Assessment **159** (1–4): 437–442.
- Bargagli R., Mikhailova I. (2002) *Accumulation of inorganic contaminants*. In Nimis P. L., Scheidegger Ch., Wolseley P. A. (eds.), Monitoring with lichens - Monitoring lichens, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London [p. 97–110].
- Beckett R. P., Kranner I., Minibayeva F. V. (2008) *Stress physiology and the symbiosis*. In: Nash T. H. (eds.), Lichen biology, Cambridge university press, Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo [p. 134–151].
- Bennett R. N., Wallsgrove R. M. (1994) *Secondary metabolites in plant defence mechanism*. New Phytologist **127**: 617–633.
- Blaž J., Baloch E., Grube M. (2006) *High photobiont diversity associated with the euryoecious lichen forming ascomycete Lecanora rupicola (Lecanoraceae, Ascomycota)*. Biological Journal of the Linnean Society **88** (2): 283–293.
- Blašík O., Adam V., Beklová M., Kizek R. (2006) *Metallothionein a jeho vztah k metabolismu iontů těžkých kovů*. Krmivářství **4**: 30–32.
- Blokhina O., Virolainen E., Kurt V. F. (2003) *Antioxidants, oxidative damage and oxygen Deprivation stress: a review*. Annals of Botany **91**: 179–194.
- Branquinho C., Catarino F., Brown D. H. (1997) *Improving the use of lichens as bioindicators of atmospheric metal pollution*. Science of the Total Environment **232** (1): 67–77.
- Brown D. H., Beckett R. P. (1984) *Uptake and effect of cations on lichen metabolism*. The Lichenologist **16** (2): 173–188.
- Brown D. H., Brown R. M. (1991) *Mineral cycling and lichens: The physiological basis*. The Lichenologist **23** (3): 293–307.

- Büdel B., Scheidegger C. (2008) *Thallus morphology and anatomy*. In: Nash T. H. (eds.), Lichen biology, Cambridge university press, Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo [p. 40–68].
- Canas M. S., Orellana L., Pignata M. (1997) *Chemical response of the lichens Parmotrema austrosinense and P. conferendum transplanted to urban and non-polluted environments*. Annales Botanici Fennici **34**: 27–34.
- Cobbet Ch., Goldsbrough P. (2002) *Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis*. Annual Review of Plant Biology **53**: 159–182.
- Cox P. W., Hooley P. (2009) *Hydrophobins: New prospects for biotechnology*. Fungal Biology Reviews **23**: 40–47.
- Cuny D., Haluwyn C. V., Shirali P., Zerimech F., Jérôme L., Haguenoer J. M. (2004) *Cellular impact of metal trace elements in terricolous lichen Diploschistes muscorum (Scop.) R. Sant. – identification of oxidative stress biomarkers*. Water, Air and Soil Pollution **152** (1–4): 55–69.
- Cuny D., Pignata M. L., Kranner I., Beckett R. (2002) *Biomarkers of pollution-induced oxidative stress and membrane damage in lichens*. In Nimis P. L., Scheidegger Ch., Wolseley P. A. (eds.), Monitoring with lichens-Monitoring lichens, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London [p. 97–110].
- Davies K. J. A. (2001) *Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems*. IUBMB Life **50**: 279–289.
- Dyer P. S. (2002) *Hydrophobins in the lichen symbiosis*. New Phytologist **154** (1): 1–4.
- Dzubaj A., Bačkor M., Tomko J., Peli E., Tuba Z. (2008) *Tolerance of the lichen Xanthoria parietina (L.) Th. Fr. to metal stress*. Ecotoxicology and Environmental Safety **70**: 319–326.
- Farrar J. F. (1976) *The uptake and metabolism of phosphate by the lichen Hypogymnia physodes*. New Phytologist **77** (1): 127–134.
- Fathi A. A., Zaki F. T., Ibraheim H. A. (2005) *Response of tolerant and wild type strains of Chlorella vulgaris to copper with special references to copper uptake system*. Protistology **4** (1): 73–78.
- Foyer Ch. H., Graham N. (2005) *Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses*. The Plant Cell **17** (7): 1866–1875.
- Friedl T., Büdel B. (2008) *Photobionts*. In: Nash T. H. (eds.), Lichen biology, Cambridge university press, Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo [p. 9–26].
- Gabriel J. (1993) *Sekundární metabolity lišejníků: I. Ochranná úloha lišejníkových látek*. Česká botanická společnost **11**: 5–6.
- Garty J. (2002) *Biomonitoring heavy metal pollution with lichens*. Protocols in lichenology [p. 458–482].
- Garty J., Galun M., Kessel M. (1979) *Localization of heavy metals and other elements accumulated in the lichen thallus*. New Phytologist **82** (1): 159–168.
- Goldsbrough P. (2000) *Metal tolerance in plants: The role of phytochelatins and metallothioneins*. In: Terry N., Banuelos G. (eds.) Phytoremediation of contaminated soil and water, CRC press, Boca Raton [p. 227–238].
- Goyal R., Seaward M. R. D. (1981) *Metal uptake in terricolous lichens, I Metal localization within the thallus*. New Phytologist **89**: 631–645.
- Goyal R., Seaward M. R. D. (1982a) *Metal uptake in terricolous lichens, II Effects on the morphology of Peltigera canina and Peltigera rufescens*. New Phytologist **90**: 73–84.
- Goyal R., Seaward M. R. D. (1982b) *Metal uptake in terricolous lichens, III Translocation in the thallus of Peltigera canina*. New Phytologist **90**: 85–98.
- Goyer R. A., Clarkson T. W. (1996) *Toxic effects of metals*. In: Casaret D., Doull J. (eds.), Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, McGraw-Hill, Kansas City [p. 811–867].
- Grill E., Winnacker E. L., Zenk M. H. (1987a) *Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins*. Proceedings of the National Academy of Sciences **84** (2): 439–443.
- Grill E., Winnacker E. L., Zenk M. H. (1987b) *Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins*. (cit. dle Grill, E., Winnacker, E. L., Zenk, M. H. [1985] *Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants*. Science **230** (4726): 674–676).
- Grotto D., Santa Maria L., Valentini J., Paniz C., Schmitt G., Garcia S. C., Pomblum V. J., Rocha J. B. T., Farina M. (2009) *Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification*. Química Nova **32** (1): 169–174.
- Günes C., Heuchel R., Georgiev O., Müller K. H., Lichtten P., Blüthmann H., Marino S., Aguzzi A., Schaffner W. (1998) *Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional aktivator MTF-1*. The EMBO Journal **17** (10): 2846–2854.

- Gutteridge J. M. C. (1995) *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage*. Clinical Chemistry **41** (12): 1819–1828.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1984) *Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease*. Biochemical Journal **219**: 1–14.
- Hare, P. D., Cress, W. A., & Van Staden, J. (2001) *The effects of exogenous proline and proline analogues on in vitro shoot organogenesis in Arabidopsis*. Plant Growth Regulation **34**(2): 203–207.
- Hauck M., Huneck S. (2007) *Lichen substances affect metal adsorption in Hypogymnia physodes*. Journal of Chemical Ecology. **33** (1): 219–223.
- Honegger R. (1986) *Ultrastructural studies in lichens*. New phytologist **103** (4): 797–808.
- Honegger R. (1991) *Functional aspects of the lichen symbiosis*. Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **42**: 553–578.
- Honegger R. (1993) *Tansley Review No. 60. Developmental biology of lichens*. New Phytologist **125**: 659–677.
- Honza J., Mareček A. (1998) **Chemie pro čtyřletá gymnázia 2. díl**, Nakladatelství Olomouc, Olomouc.
- Huneck S. (1999) *The significance of lichens and their metabolites*. Naturwissenschaften **86** (12): 559–570.
- Chen Ch. T., Chen L-M., Lin Ch. Ch., Kao Ch. H. (2001) *Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper*. Plant Science **160**: 283–290.
- Chettri M. K., Cook C. M., Vardaka E., Sawidis T., Lanaras T. (1998) *The effect of Cu, Zn and Pb on the chlorophyll content of the lichens Cladonia convoluta and Cladonia rangiformis*. Environmental and Experimental Botany **39** (1): 1–10.
- Kafka Z., Punčochářová J. (2002) *Těžké kovy v přírodě a jejich toxicita*. Chemické listy **96**: 611–617.
- Kalina T., Váňa J. (2010) *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Nakladatelství Karolinum, Praha [p. 394–405].
- Karim P., Khavari-Nejad R. A., Nikham V., Ghahremaninejad F., Najaf F. (2012) *The effects of excess copper on antioxidative enzymes, lipid peroxidation, proline, chlorophyll and concentration of Mn, Fe and Cu in Astragalus neomobayemii*. The Scientific World Journal **2012**: 1–6.
- Kincl L., Kincl M., Jakrllová J. (2000) *Biologie rostlin*. Nakladatelství Fortuna, Praha [p. 195–198].
- Klaasen C. D., Liu J., Chodhuri S. (1999) *Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology **39**: 267–294.
- Kranner I., Cram W. J., Zorn M., Wornik S., Yoshimura I., Stabentheiner E., Pfeifhofer H. W. (2005) *Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners*. Proceedings of the National Academy of Sciences **102** (8): 3141–3146.
- Kranner I., Grill D. (1996) *Determination of glutathione and glutathione disulphide in lichens: a comparison of frequently used methods*. Phytochemical Analysis **7** (1): 24–28.
- Krotz R. M., Evangelou B. P., Wagner G. J. (1989) *Relationships between Cadmium, Zinc, Cd-Peptide, and Organic Acid in Tobacco Suspension Cells*. The Plant Physiology **91**: 780–787.
- Krzesłowska M. (2011a) *The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy*. Acta Physiologiae Plantarum **33**: 35–51.
- Krzesłowska M. (2011b) *The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy*. (cit. dle Dronnet V. M., Renard C. M. G. C., Axelos M. A. V., Thibault J. F. [1996] *Heavy metals binding by pectins: selectivity, quantification and characterization*. Carbohydrate Polymers **30**: 253–263).
- Küpper H., Šetlík I., Spiller M., Küpper F. C., Prášil O. (2002) *Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation*. Journal of Phycology **38**: 429–441.
- Lane, B., Kajioka, R., and Kennedy, T. (1987) *The wheat-germ Ec protein is a zinc-containing metallothionein*. Biochemistry and Cell Biology **65**: 1001–1005.
- Lange O. L., Ziegler H. (1963) *Der Schwermetallgehalt von Flechten aus dem Acarosporium sinopicae auf Erzschlackenhalde des Harzes: Eisen und Kupfer I*. Mitteilungen der Floristisch-soziologischen Arbeitsgemeinschaft. Neue Folge **10**: 156–183.
- Lawrey J. D. (1986) *Biological role of lichen substances*. The Bryologist **111**: 111–122.
- Mareček A., Honza J. (1998) **Chemie pro čtyřletá gymnázia 1. díl**, Nakladatelství Olomouc, Olomouc.
- Margoshes M., Vallee B. L. (1957) *A cadmium protein from equine kidney cortex*. Journal of the American Chemical Society **79** (17): 4813–4814.
- Mehra A., Farago M. E. (1994) *Metals ions and plant nutrition*. In: Farago M. E. (eds.), Plants and chemical elements - Biochemistry, uptake, tolerance and toxicity, VCH, Weinheim [p 32–36].

- Mehta S. K., Gaur J. P. (1999) *Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in Chlorella vulgaris*. New Phytologist **163**: 253–259.
- Morris C. A., Nicolaus B., Sampson V., Harwood J. L., Kille P. (1999) *Identification and characterization of a recombinant metallothionein protein from a marine alga, Fucus vesiculosus*. Biochemical Journal **338**: 553–560.
- Murasugi A., Wada Ch., Hayashi Y. (1981) *Cadmium-binding peptide induced in fission yeast, Schizosaccharomyces pombe*. Journal of Biochemistry **90**: 1561–1564.
- Nash T. H. (1972) *Simplification of the Blue Mountain lichen communities Near a zinc factory*. The Bryologist 315–324.
- Nash T. H. (1989) *Metal tolerance in lichens*. In: Shaw A. J. (eds.), Heavy metal Tolerance in plants: Evolutionary Aspects, CRC press, Boca Raton [p. 119–131].
- Nieboer E. Richardson D. H. S. (1980b) *The replacement of the nondescript term “heavy metals” by a biologically and chemically significant classification of metal ions*. Environmental Pollution **1**: 3–26.
- Nieboer E. Richardson D. H. S. (1980a) *The replacement of the nondescript term “heavy metals” by a biologically and chemically significant classification of metal ions*. (cit. dle Lapedes [1974] Dictionary of scientific and technical terms. New York, McGraw Hill [p. 674]).
- Nieboer E., Richardson D. H. S., Tomassini F. D. (1978). *Mineral uptake and release by lichens: an overview*. The Bryologist 226–246.
- Olafson R. W., William D. M., Kay C. M. (1988) *Primary-and secondary-structural analysis of a unique prokaryotic metallothionein from a Synechococcus sp. cyanobacterium*. Biochemical Journal **251**: 691–699.
- Pal R., Rai J. P. N. (2010) *Phytochelatins: peptides involved in heavy metal detoxification*. Applied Biochemistry and Biotechnology **160** (3): 945–963.
- Palice Z., Halda J. P. (2005) *Neviditelný svět mikrobiologie*. Živa **2**: 57–59.
- Palmqvist K. (2000) *Tansley review no. 117. Carbon economy in lichens*. New Phytologist **148**: 11–36.
- Paoli L., Pisani T., Guttová A., Sardella G., Loppi S. (2010) *Physiological and chemical response of lichens transplanted in and around an industrial area of south Italy: relationship with the lichen diversity*. Ecotoxicology and Environmental Safety **74**: 650–657.
- Pavlová L. (2005) *Fyziologie rostlin*. Nakladatelství Karolinum, Praha [p. 134–140].
- Pawlik-Skowrońska B., Bačkor M. (2011) *Zn/Pb-tolerant lichens with higher content of secondary metabolites produce less phytochelatins than specimens living in unpolluted habitats*. Environmental and Experimental Botany **72** (1): 64–70.
- Pawlik-Skowrońska B., Sanità di Toppi L., Favali M. A., Fossati F., Pirszel J., Skowroński T. (2002) *Lichens respond to heavy metals by phytochelatin synthesis*. New Phytologist **156** (1): 95–102.
- Perales-Vela H. V., Pena-Castro J. M., Canizares-Villanueva R. O. (2006) *Heavy metal detoxification in eucaryotic microalgae*. Chemosphere **64**: 1–10.
- Pinto E., Sigaud-Kutner T. C. S., Kitão M. A. S., Okamoto O. K., Morse D., Colepicolo P. (2003) *Heavy metal-induced oxidative stress in algae*. Journal of Phycology **39**: 1008–1018.
- Pitter P. (1999) *Hydrochemie*. Nakladatelství VŠCHT, Praha [p. 75–162].
- Pöykkö H., Bačkor M., Bencúrová E., Molcanová V., Bačkorová M., Hyvärinen M. (2010) *Host use of a specialist lichen-feeder: dealing with lichen secondary metabolites*. Oecologia **164** (2): 423–430.
- Puckett K. J. (1976) *The effect of heavy metals on some aspects of lichen physiology*. Canadian Journal of Botany **54** (23): 2695–2703.
- Purvis O. W., Halls C. (1996) *Review of lichens in metal-enriched environments*. The Lichenologist **28** (6): 571–601.
- Purvis O. W., Pawlik-Skowrońska B. (2008) *Lichens and metals*. The British Mycological Society Symposia Series **27**: 175–200.
- Raudenská M., Šmerková K., Tanhäuserová V., Gumulec J., Hlavna M., Sztalmachová M., Pácal L., Babula P., Adam V., Echschrager T., Kizek R., Masařík M. (2012) *Metallothionein a jeho role v detoxikaci těžkých kovů a predispozici k chorobám*. Praktický lékař **92** (2): 322–326.
- Rausser, W. E. (1990) *Phytochelatins*. Annual Review of Biochemistry **59**: 61–86.
- Rausser, W. E. (1999) *Structure and function of metal chelators produced by plants*. Cell Biochemistry and Biophysics **31**: 19–48.
- Rausser, W. E. (1999b) *Structure and function of metal chelators produced by plants*. (cit. dle Kondo et al. [1984] *Cadystin A and B, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast-separation, revision of structures and synthesis*. Tetrahedron Letters **25**: 3869–3872).
- Robinson N. J., Tommey A. M., Kuske C., Jackson P. J. (1993) *Plant metallothionein*. Biochemical Journal **295**: 1–10.

- Sarret G., Manceau A., Cuny D., Haluwyn C. V., Déruelle S., Hazemann J-L., Soldo Y., Eybert - Bérald L., Menthonnex J-J. (1998) *Mechanisms of lichen resistance to metallic pollution*. Environmental Science and Technology **32** (21): 3325–3330.
- Saxena S., Upreti D. K., Sharma N. (2007) *Heavy metal accumulation in lichens growing in north side of Lucknow city, India*. Journal of Environmental Biology **28** (1): 49–51.
- Shukla V., Upreti D. K. (2007) *Heavy metal accumulation in Phaeophyscia hispidicula en Route to Badrinath, Uttarakhand, India*. Environmental Monitoring and Assessment **131**: 365–369.
- Smith C. W., Aptroot A., Coppins B. J., Fletcher A., Gilbert O. L., James P. W., Wolseley P. A. (2009) *The lichens of Great Britain and Ireland*. British Lichen Society, London [p. 6–10].
- Takahagi T., Endo T., Yamamoto Y., Sato F. (2008) *Lichen photobionts show tolerance against lichen acids produced by lichen mycobionts*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **72** (12): 3122–3127.
- Tarhanen S. (1998) *Ultrastructural responses of the lichen Bryoria fuscescens to simulated acid rain and heavy metal deposition*. Annals of Botany **82** (6): 735–746.
- Tlustoš P., Pavlíková D., Balík J. (2006) *Mechanismus příjmu rizikových prvků rostlinami a jejich hromadění v biomase*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha [p. 1–37].
- Townsend C. R., Begon M., Harper J. L. (2010) *Základy ekologie*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc [p. 423–454].
- Tschermak-Woess E. (1988) *The algal partner*. In: Galun M. (eds.), CRC Handbook of Lichenology 1, CRC press, Boca Raton [p. 39–92].
- Wang J., Evangelou B. P., Nielsen M. T., Wagner G. J. (1992) *Computer, Simulated Evaluation of Possible Mechanisms for Sequestering Metal Ion Activity in Plant Vacuoles*. Plant Physiology **99**: 621–626.
- Weber H., Chételat A., Reymond P., Farmer E. E. (2004) *Selective and powerful stress gene expression in Arabidopsis in response to malondialdehyde*. The Plant Journal **37**: 877–888.
- Wessels J. G. H. (2000) *Hydrophobins, unique fungal proteins*. The Mycologist **14** (4): 153–159.
- Wessels J. G. H., de Vries O. M. H., Ásgeirsdóttir S. A., Schuren F. H. (1991) *Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in Schizophyllum*. The Plant Cell **3**: 793–799.
- White J. F., Torres M. S. (2010) *Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection?* Physiologia Plantarum **138**: 440–446.
- Williamson B. J., Mikhailova I., Purvis O. W., Udachin V. (2004) *SEM-EDX analysis in the source apportionment of particulate matter on Hypogymnia physodes lichen transplants around the Cu smelter and former mining town of Karabash, South Urals, Russia*. Science of the Total Environment **322** (1): 139–154.
- Wornik S., Grube M. (2010) *Joint Dispersal Does Not Imply Maintenance of Partnerships in Lichen Symbioses*. Microbial Ecology **59** (1): 150–157.
- Wu J. T., Hsieh M. T., Kow L. Ch. (1998) *Role of proline accumulation in response to toxic copper in Chlorella sp. (Chlorophyceae) cell*. Journal of Phycology **34**: 113–117.
- Yahr R., Vilgalys R., DePriest P. T. (2004) *Strong fungal specificity and selectivity for algal symbionts in Florida scrub Cladonia lichens*. Molecular Ecology **13**: 3367–3378.
- Zelená J., Potěšil D., Vacek J., Adam V., Hradecký J., Průša R., Kizek R., Vojtíšek B. (2004) *Methalothionein jako prognostický marker nádorového onemocnění*. Klinická onkologie **17** (6): 140–195.
- Zítka O., Stejskal K., Kleckerová A., Adam V., Beklová M., Horna A., Šupálková V., Havel L., Kizek R. (2007) *Využití elektrochemických technik pro analýzu biologických vzorků*. Chemické listy **101**: 225–231.

Použité internetové zdroje

WEB 1 Fargašová A. *Distribúcia kovov v životnom prostredí*. URL:

http://www.enviro-edu.sk/database/environmentalne_problemy/distribucia_kovov_v_zivotnom_prostredi/Enviro-edu_4012_Globalne_znecistenie_kovmi.pdf (staženo 13.12.2013).

WEB 2 Kodíček M. *Prolin*. [Kodíček M. (eds.) Biochemické pojmy: výkladový slovník. VŠCHT Praha]. URL:

http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=prolin (navštíveno 8.5.2014).

WEB 3 Kumar A., Singh N., Gaurau S. S., Gupta H. *Bioremediation of metal contaminated sites by naturely growing lichens found in Hilly area of Himachal Prades*. URL:

<http://aiasi.in/journals/Privious/BIOREMEDIATION%20OF%20METAL%20CONTAMINATED%20SITES%20BY%20NATURALLY%20GROWING%20LICHENS%20FOUND%20IN%20HILLY%20AREAS%20OF%20HIMACHAL%20PRADESH.pdf> (staženo XX).

WEB 4 Liška J. (2005) *Lišejníky*. [In: Kučera T.(eds.) Červená kniha biotopů v České republice [URL:

http://www.biomonitoring.cz/biotop_cerv_kn/texty/8/index.html],630/02/03]. URL:

http://www.biomonitoring.cz/biotop_cerv_kn/texty/8/texty/tax_skupiny/lisejniky_liska.pdf (staženo 22.9.2012).

WEB 5 *Peroxidace lipidů*. – články a informace z různých oblastí lékařství. URL:

<http://www.biology.estranky.cz/clanky/biochemie/peroxidace-lipidu.html> (navštíveno 8.5.2014).

WEB 6 *Vývojové fáze kultury*. – [VOŠ a SPŠ Varnsdorf, 198P2006 – Pilotní projekt SIPVZ]. URL:

http://www.vosvf.cz/projekty/workshop/materialy/02_neoliticka-revoluce.pdf (staženo 20.2.2014).

WEB 7 *Biogenní prvky*. – [MENDELÚ, projekt č. 1168/2003]. URL:

http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/biogenni_prvky/a_index_biogen.html(navštíveno 8.5.2014).

Použitá literatura – příloha

- 1 Adamo P., Arienzo M., Pugliese M., Roca V., Violante P. (2004) *Accumulation history of radionuclides in the lichen Stereocaulon vesuvianum from Mt. Vesuvius (south Italy)*. Environmental Pollution **127** (3): 455–461.
- 2 Alstrup V., Hansen E. S. (1977) *Three species of lichens tolerant of high concentrations of copper*. Oikos **29**: 290–293.
- 3 Bačkor M., Loppi S. (2009) *Interaction of lichens with heavy metals*. Biologia plantarum **53** (2): 214–222.
- 4 Bačkor M., Fahselt D. (2004) *Physiological attributes of the lichen Cladonia pleurota in heavy metal-rich and control sites near Sudbury (Ont., Canada)*. Environmental and Experimental Botany **52** (2): 149–159.
- 5 Pawlik-Skowrońska B., Purvis O. W., Pirszel J., Skowroński T. (2006) *Cellular mechanism of Cu-tolerance in the epilithic lichen Lecanora polytropa growing at a copper mine*. The Lichenologist **38** (3): 267–275.
- 6 Bačkor M., Fahselt D., Davidson R. D., Wu C. T. (2003) *Effects of Copper on Wild and Tolerant Strains of the Lichen Photobiont Trebouxia erici (Chlorophyta) and Possible Tolerance Mechanisms*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **45** (2): 159–167.
- 7 Bačkor M., Kováček J., Dzubaj A., Bačkorová M. (2009) *Physiological comparsion of copper toxicity in the lichens Peltigera rufescens (Weis) Humb. and Cladina arbuscula subsp. mitis (Sandst.) Ruoss*. Plant Growth Regul **58** (3): 279–286.
- 8 Bačkor M., Pawlik-Skowrońska B., Budřová J., Skowroński T. (2007) *Response to copper and cadmium stress in wild-type and copper tolerant strains of the lichen alga Trebouxia erici: metal accumulation, toxicity and non-protein thiols*. Plant Growth Regul **52** (1): 17–27.
- 9 Bačkor M., Peksa O., Škaloud P., Bačkorová M. (2010) *Photobiont diversity in lichens from metal-rich substrat abased on ITS rDNA sequences*. Ecotoxicology and Environmental Safety **73** (4): 603–612.
- 10 Bačkor M., Péli E. R., Vantová I. (2011) *Copper tolerance in the macrolichens Cladonia furcata and Cladina arbuscula subsp. mitis is constitutive rather than inducible*. Chemosphere **85** (1): 106–113.
- 11 Skalka M. (2003) *Lišejníky jako bioindikátory*. Živa **3**: 107–108.
- 12 Fahselt D., Wu T. W., Mott B. (1995) *Trace element patterns in lichens following uranium mine closures*. The Bryologist **98** (2): 228–234
- 13 Bajpai R., Upreti D. K., Dwivedi S. K. (2009) *Arsenic accumulation in lichens of Mandav monuments, Dhar district, Madhya Pradesh, India*. Environmental monitoring and assessment **159** (1–4): 437–442.
- 14 Banášová V. *Rostliny na banských odpadoch*.
<<http://www.banskeodpady.sk/files/Viera%20Ban%C3%A1sov%C3%A1.pdf>>

- 15 Banášová V. (2006) *The participation of lichens in species diversity of mine waste vegetation*. In: Lackovičová A., Guttová A., Lisická E., Lizoň P. (eds.), *Central European lichens - diversity and threat*, Mycotaxon Ltd., Ithaca [p. 205–218].
- 16 Banášová V., Čiamporová M., Nedubinská M. *Heavy metal localities and their vegetation in Slovakia*.
<http://www.metal tolerant plants.sav.sk/Publications/HM_sites_Slovakia.pdf>
- 17 Banášová V., Horak O., Čiamporová M., Nadubinská M., Lichtscheidl I. (2006) *The vegetation of metalliferous and non-metalliferous grasslands in two former mine regions in Central Slovakia*. *Biologia* **61** (4): 433–439.
- 18 Banášová V., Pišút I., Lintnerová O. (2003) *Poznámky ku špecifickej vegetácii na haldách trosky pri Smolníku (Slovenské rudohorie)*. *Bulletin Slovenskej botanickej spoločnosti* **25**: 135–141.
- 19 Bayerová Š., Halda J., Liška J., Uhlík P. (2004a) *Príspevek k poznání lichenoflóry Krušných hor*. *Bryonora* **33**: 28–35.
- 20 Bayerová Š., Halda J., Liška J., Uhlík P. (2004b) *Rhizocarpon ridescens a Verrucaria ochrostoma - dva nové druhy lišejníků pro Českou republiku*. *Bryonora* **33**: 26–27.
- 21 Bennett J. P. (2011) *Copper mines may affect lichens of two Southern Arizona national protected areas*. *Bibliotheca Lichenologica* **106**: 7–14.
- 22 Lawrey J. D., Hale M. E. (1981) *Retrospective study of lichen lead accumulation in the Northern United States*. *The Bryologist* **84** (4): 449–456.
- 23 Chettri M. K., Sawidis T., Zachariadis G. A., Stratis J. A. (1997) *Uptake of heavy metals by living and dead Cladonia thalli*. *Environmental and Experimental Botany* **37** (1): 39–52.
- 24 Coppins B. J., van den Boom P. P. G. (1995) *Micarea confusa: a new species from zinc- and cadmium-contaminated soils in Belgium and the Netherlands*. *The Lichenologist* **27** (2): 81–90.
- 25 Sarret G., Manceau A., Cuny D., Haluwyn C. V., Déruelle S., Hazemann J.-L., Soldo Y., Eybert-Bérald L., Menthonnex J.-J. (1998) *Mechanisms of lichen resistance to metallic pollution*. *Environmental Science and Technology* **32** (21): 3325–3330.
- 26 Halda J., Uhlík P. (2011) *Lišejníky rudných hald na Tisovci u Kraslic*. *Příroda Kraslicka* **3**: 37–50.
- 27 Howe N. M., Lendemer J. C. (2011) *The recovery of a simplified lichen community near the Palmerton zinc smelter after 34 years*. *Bibliotheca lichenologica* **106**: 127–142.
- 28 Garty J., Galun M., Kessel M. (1979) *Localization of heavy metals and other elements accumulated in the lichen thalus*. *New Phytologist* **82** (1): 159–168.
- 29 Lackovičová A., Liška J., Pišút I. (1977) *Lišajníky medených hald v okolí Gelnice a Slovínok (Východné Slovensko)*. *Múzeum, Bratislava* **22**: 92–98.
- 30 Lamb M. (1977) *A conspectus of the lichen genus Stereocaulon (Schreb.)*. *Journal Hattori Botanical Laboratory* **43**: 191–355.
- 31 Malíček J. (2010) *Zajímavé nálezy lišejníků v údolí Kocáby u Nového Knína (Střední Čechy)*. *Bryonora* **45**: 19–30.
- 32 Mikyška R. *O vegetaci na haldách kamenečných břidlic u Hromnic na Plzeňsku*. Separátní otisk z časopisu „Lesnická práce“ **25 (9–10)**: 1–26.
- 33 Nash T. H. (1989) *Metal tolerance in lichens*. In: Shaw A. J. (eds.), *Heavy metal Tolerance in plants: Evolutionary Aspects*, CRC press, Boca Raton [p. 119–131].
- 34 Ernst G. (1995) *Vezdaea leprosa – spezialist am Strassenrand*. *Herzogia* **11**: 175–188.
- 35 Palice Z., Steinová J., Malíček J. (2008) *Tři nové korovité (vegetativně se množící) lišejníky pro ČR z hornin bohatých na železo a měď*. *Bryonora* **42**: 12–16.
- 36 Pandey V., Upreti D. K. (2000) *Determination of heavy metals in lichens growing on different ecological habitats in Schirmacher oasis, East Antarctica*. *Spectroscopy Letters* **33** (3): 435–444.
- 37 Pawlik-Skowrońska B., Bačkor M. (2011) *Zn/Pb-tolerant lichens with higher content of secondary metabolites produce less phytochelators than specimens living in unpolluted habitats*. *Environmental and Experimental Botany* **72** (1): 64–70.
- 38 Purvis O. W. (1984) *The occurrence of copper oxalate in lichens growing on copper sulphide-bearing rocks in Scandinavia*. *Lichenologist* **16** (2): 197–204.
- 39 Purvis O. W., Elix J. A., Gaul L. K. (1990) *The occurrence of copper-psoromic acid in lichens from cupriferous substrata*. *Lichenologist* **22** (3): 345–354.
- 40 Purvis O. W., Halls C. (1996) *Review of lichens in metal-enriched environments*. *The Lichenologist* **28** (6): 571–601.
- 41 Rao D. N., Robitaille G., LeBlanc F. (1977) *Influence of heavy metal pollution on lichens and bryophytes*. *Journal Hattori Botanical Laboratory* **42**: 213–239.
- 42 Rusu A.-M., Chimonides P. D. J., Jones G. C., Garcia-Sanchez R., Purvis O. W. (2006) *Multi-element including rare earth content of lichens, bark, soils, and waste following industrial closure*. *Environmental Science and Technology* **40** (15): 4599–4604.

- 43 Suza J. (1947) *O výskytu ferrofilních lišejníků na západní Moravě*. Věstník Královské české společnosti nauk **1946**: 1–30.
- 44 Vondrák J., Palice Z. (2004) *Lichenologicky významná lokalita Zábrdská skála v Prachatickém předšumaví*. Bryonora **33**: 22–26.
- 45 Cuny D., Haluwyn C. V., Shirali P., Zerimech F., Jérôme L., Haguenoer J. M. (2004) *Cellular impact of metal trace elements in terricolous lichen Diploschistes muscorum (Scop.) R. Sant. - identification of oxidative stress biomarkers*. Water, Air and Soil Pollution **152 (1–4)**: 55–69.
- 46 Garty J. (1987) *The amounts of Ni, Cr, Zn, Pb, Cu, Fe and Mn in some lichens growing in Switzerland*. Environmental and Experimental Botany **27 (2)**: 127–138.
- 47 Laaksovirta K., Olkkonen H., Alakuijala P. (1976) *Observations on the lead content of lichen and bark adjacent to a highway in Southern Finland*. Environmental pollution **11 (4)**: 247–255.
- 48 Brown D. H. *Mineral uptake by lichens*. In: Brown D. H., Hawksworth D. L., Bailey R. H. (eds.), Lichenology: progress and problems, Academic press, London, New York, San Francisco [p. 419–439].
- 49 van Haluwyn C., van Herk C. M. *Bioindication: the community approach*. In: Nimis P. L., Scheidegger Ch., Wolseley P. A. (eds.), Monitoring with lichens - Monitoring lichens, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London [p. 39–64].
- 50 Chisholm J. E., Jones G. C., Purvis O. W. (1987) *Hydrated copper oxalate, moolooite, in lichens*. Mineralogical magazine **51 (363)**: 715–718.
- 51 Pawlik-Skowrońska B., Wójciak H., Skowroński T. (2008) *Heavy metal accumulation resistance and physiological status of some epigeic and epiphytic lichens inhabiting Zn and Pb polluted areas*. Polish Journal of Ecology **56 (2)**: 195–207.
- 52 Poelt J., Huneck S. (1968) *Lecanra vinetorum nova spec., ihre Vergesellschaftung, ihre Ökologie und ihre Chemie*. Österreichische botanische Zeitschrift **115 (4–5)**: 411–422.
- 53 Hickmott M. (1980) *Lichens on lead*. The Lichenologist **12 (3)**: 405–406.
- 54 Vězda A. (1978) *Neue oder wenig bekannte Flechten in der Tschechoslowakei. II*. Folia Geobotanica et Phytotaxonomica **13 (4)**: 397–420.
- 55 Branquinho C., Matos P., Vieira A. R., Ramos M. M. P. (2011) *The relative impact of lichen symbiotic partners to repeated copper uptake*. Environmental and Experimental Botany **72 (1)**: 84–92.
- 56 Hauck M., Huneck S. (2007) *Lichen substances affect metal adsorption in Hypogymnia physodes*. Journal of chemical ecology. **33 (1)**: 219–223.
- 57 Purvis O. W., Pawlik-Skowrońska B. (2008) *Lichens and metals*. The British Mycological Society Symposia Series **27**: 175–200.

Příloha

Přehled jednotlivých druhů lišejníků rostoucích na substrátech s vyšším obsahem kovů.

Výskyt lišejníku na místě s vyšším obsahem určitého kovu je vyznačen podbarvením příslušného pole spolu s uvedením čísla, které odpovídá číslování článků použité literatury (seznam použité literatury je pro přílohu zpracován samostatně).